

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

PROTEOLIZA I PROMJENE TEKSTURE SIRA IZ MIŠINE
TIJEKOM ZRENJA

DIPLOMSKI RAD

Denis Petrović

Zagreb, rujan 2017.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

Diplomski studij:
Proizvodnja i prerada mlijeka

PROTEOLIZA I PROMJENE TEKSTURE SIRA IZ MIŠINE
TIJEKOM ZRENJA

DIPLOMSKI RAD

Denis Petrović

Mentor: Doc.dr.sc. Milna Tudor Kalit

Zagreb, rujan 2017.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

IZJAVA STUDENTA
O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, **Denis Petrović**, JMBAG 0125150814, rođen 25. kolovoza 1992. u Puli, izjavljujem
da sam samostalno izradio diplomski rad pod naslovom:

PROTEOLIZA I PROMJENE TEKSTURE SIRA IZ MIŠINE TIJEKOM ZRENJA

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedini autor ovoga diplomskog rada;
- da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, adekvatno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada;
- da ovaj diplomski rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnog ili stručnog studija;
- da je elektronička verzija ovoga diplomskog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor;
- da sam upoznat s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana _____

Potpis studenta

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

IZVJEŠĆE

O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studenta **Denisa Petrovića**, JMBAG 0125150814, naslova

PROTEOLIZA I PROMJENE TEKSTURE SIRA IZ MIŠINE TIJEKOM ZRENJA

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____, dana _____.

Povjerenstvo:

potpisi:

1. Doc.dr.sc. Milna Tudor Kalit, mentor

2. Prof.dr.sc. Samir Kalit, član

3. Doc.dr.sc. Nataša Mikulec, član

Zahvala

Zahvaljujem mentorici, doc. dr. sc. Milni Tudor Kalit na predloženoj temi, vremenu, trudu, stručnoj pomoći i korisnim savjetima tijekom izrade ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem članovima stručnog povjerenstva, prof. dr. sc. Samiru Kalitu i doc. dr. sc. Nataši Mikulec koji su korisnim savjetima neizmjereno doprinijeli kvaliteti ovog rada.

Veliko hvala mojoj braći, Paolu i Rafaelu na bratskoj ljubavi, podršci i razumijevanju, te našoj Eleni i malom Luki.

Iskreno hvala mojim dragim ljudima koji su uvijek uz mene: Nina Velnić, Marija Dokozić, Josipa Valovičić, Magdalena Vnućec, Nives Kalit i Bruno Štefić.

*Osobito zahvaljujem svome **ocu** i svojoj **majci** na bezuvjetnoj ljubavi i podršci koju su mi pružali sve ove godine i bez kojih moje studiranje ne bi bilo moguće. Hvala Vam od srca. Ovaj rad posvećujem Vama!*

Sadržaj

1. Uvod	1
1.1 Cilj istraživanja.....	2
2. Pregled dosadašnjih istraživanja	3
2.1 Kazeinska micela i mehanizmi koagulacije mlijeka	3
2.2 Biokemijski procesi tijekom zrenja sira.....	4
2.3.1. Glikoliza	5
2.3.2. Lipoliza.....	6
2.3.3. Proteoliza	7
2.3 Teorija balansnih spojeva	9
2.4 Tekstura sireva.....	10
2.5 Povezanost proteolize i teksture sira.....	11
2.6 Glavne osobitosti sira iz mišine	13
2.7 Tehnologija proizvodnje sira iz mišine.....	14
3. Materijali i metode istraživanja.....	16
3.1 Tehnologija proizvodnje sira iz mišine u pokusu	16
3.2 Uzorkovanje mlijeka i sira	20
3.3 Analize ovčjeg mlijeka.....	20
3.4 Analize kemijskog sastava i fizikalnih svojstava sira iz mišine.....	20
3.5 Analize primarnih i sekundarnih proteolitičkih promjena u siru iz mišine tijekom zrenja	21
3.6 Mjerenje čvrstoće sira	22
3.7 Statistička obrada	23
4. Rezultati i rasprava	24
4.1 Fizikalno-kemijska svojstva ovčjeg mlijeka	24
4.2 Fizikalno-kemijski sastav sira iz mišine	26
4.3 Fizikalno-kemijske promjene sira iz mišine tijekom zrenja	29
4.4 Proteolitičke i teksturne promjene sira iz mišine tijekom zrenja	31
4.5 Povezanost fizikalno-kemijskih, proteolitičkih i teksturnih promjena sira iz mišine tijekom zrenja	34
5. Zaključci	36
6. Popis literature	37
7. Popis slika i tablica	51
8. Životopis autora	52

Sažetak

Diplomski rad studenta **Denisa Petrovića**, naslova

PROTEOLIZA I PROMJENE TEKSTURE SIRA IZ MIŠINE TIJEKOM ZRENJA

Sir iz mišine hrvatski je autohtoni tvrdi ovčji sir. Njegovo je glavno obilježje zrenje u janjećoj koži. S obzirom na to da kazein čini temelj sirne mase u koju su ugrađeni drugi spojevi, proteoliza se smatra najvažnijim procesom koji doprinosi nastajanju karakteristične teksture sira. Nadalje, proteoliza sudjeluje i u kreiranju poželjne arome sira.

Cilj je ovog rada odrediti fizikalno-kemijske, proteolitičke i teksturne promjene tijekom 30 dana zrenja sira iz mišine i povezanost fizikalno-kemijskih osobina sira s njegovim proteolitičkim i tekturnim promjenama.

Istraživanje je provedeno na deset proizvodnih serija sira proizvedenih na malom obiteljskom poljoprivrednom gospodarstvu. Iz svake serije uzeti su uzorci gruša i sira nakon 15 i 30 dana zrenja. Fizikalno-kemijske analize sira uključivale su određivanje pH-vrijednosti, suhe tvari, mliječne masti, proteina i soli. Proteolitičke promjene u siru praćene su određivanjem udjela α_1 -kazeina, α_1 -I-kazeina, β -kazeina, γ -kazeina, frakcije dušika topljive u vodi (WSN %TN) i 12 %-tnoj trikloroctenoj kiselini (TCA-SN %TN) u odnosu na ukupni dušik i indeksa zrenja (alfa i beta). Tekstura sira određena je testom kompresije.

Vrijeme zrenja imalo je znatan učinak na fizikalno-kemijske, proteolitičke i teksturne parametre ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Udio proteina, TCA-SN %TN, indeks alfa ($P < 0.05$), α_1 -kazeina, β -kazeina, γ -kazeina i indeks beta ($P < 0.01$) bilo je u korelaciji je s teksturom sira.

Na temelju rezultata istraživanja može se zaključiti da je proteolizavažna za postizanje željene senzorne kvalitete sira, koja se sastoji od izgleda, arome, boje, mirisa i teksture.

Ključne riječi: *proteoliza, tekstura, senzorna kvaliteta, sir iz mišine, tradicionalni sirevi*

Summary

Of the master's thesis – student **Denis Petrović**, entitled

PROTEOLYTIC AND TEXTURAL CHANGES DURING THE RIPENING OF CHEESE IN A SACK

Cheese in a sack is a Croatian autochthonous hard ewe's milk cheese. Its main specificity is ripening in a sack made of lamb skin. As casein forms the base of cheese structure in which other compounds are incorporated, proteolysis is considered to be the most important process which contributes to the formation of the characteristic cheese texture. Moreover, proteolysis is involved in the formation of a desirable cheese flavour.

The aim of this research was to determine physicochemical, proteolytic and textural changes over 30 days of cheese ripening, and correlations between physicochemical and proteolitical as well as textural changes of cheese during its ripening in a sack.

Research was conducted on 10 batches of cheese which were manufactured at a small-scale dairy farm. From each batch, samples of curd and cheese at 15 and 30 days of ripening were taken. Physicochemical analyses of cheese included determination of pH value, total solids, fat, protein and salt content. The proteolytic changes in cheese were monitored by determining the content of α s₁-casein, α s₁-I-casein, β -casein, γ -casein, water-soluble nitrogen fraction (WSN %TN) and 12%-trichloroacetic acid soluble nitrogen fraction (TCA-SN %TN) in the total nitrogen, and ripening indexes (alpha and betta). The cheese texture was determined by a compression test.

The time of ripening had a significant effect on the observed physicochemical, proteolytic and textural parameters ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The content of protein, TCA-SN %TN, index alpha ($P < 0.05$), α s₁-casein, β -casein, γ -casein and index betta ($P < 0.01$) correlated significantly with the cheese texture.

Proteolysis is very important for achieving the desirable sensorial quality of cheese, which consists of appearance, flavour, colour, odour and texture.

Key words:

Proteolysis, texture, sensorial quality, cheese in a sack, traditional cheeses

1. Uvod

Proizvodnja sira od toplinski neobrađenog mlijeka, uz upotrebu prirodnih sirila, s dodatkom mikrobnih kultura ili bez nje te originalnost proizvodnje i izvornost sirovine uz znatni utrošak ljudskog rada glavne su karakteristike autohtonog sirarstva iz kojeg je potekla i većina sireva na svjetskom tržištu (Lukač Havranek, 1995; Matutinović i sur., 2007; Kalit, 2015). Jedna od glavnih razlika između sireva dobivenih od pasteriziranog mlijeka i autohtonih sireva jest izraženiji okus, kraće vrijeme zrenja i drugačija tekstura potonjih (Samaržija, 2015). Značajno je napomenuti kako u proizvodnji autohtonih sireva treba osigurati mlijeko besprijekorne mikrobiološke kvalitete, što se postiže visokim higijenskim standardima u hladnom lancu te zdravstvenom zaštitom muznih životinja (Bachmann i sur., 1996; Samaržija i Antunac, 2002; Zebec, 2016). Međutim, upravo su nezadovoljavajući higijenski uvjeti i nestandardizirana proizvodnja ozbiljan problem autohtonog sirarstva, objašnjavaju Sarić i sur. (2007). Naglim razvojem industrije, mlijeko se zbog zdravstvene ispravnosti počinje pasterizirati, što sirarski gurmani smatraju "ubojicom" okusa (Kalit, 2015), a što je gotovo dovelo do izumiranja proizvodnje hrvatskih autohtonih sireva i gubitka njihove autentičnosti, budući da se toplinskom obradom uništava nestarterska mikroba populacija (non starter lactic acid bacteria-NSLAB) (Sarić i sur., 2007; Havranek i sur., 2014).

U Republici Hrvatskoj poznato je oko trideset različitih vrsta autohtonih sireva, od kojih su najpoznatiji paški sir i ostali otočki sirevi (krčki, creski, rapski, brački, olipski), Istarski sir, Tounjski sir, Lički Škripavac, Dubrovački sir (Tratnik i Božanić, 2012; Tudor Kalit, 2012) dok su Parmigiano Reggiano, Grana Padano, Camambert, Brie, Roquefort, Ementalac i Gruyere neki od najpoznatijih sireva s područja Europe (Lukač Havranek, 1995; Zebec, 2016).

Većina se hrvatskih autohtonih sireva proizvodi od punomasnog sirovog ovčjeg mlijeka u varijantama tvrdih sireva (Lukač Havranek i sur., 2000), a proizvodnja je uglavnom lokalnog (Samaržija, 2003) i sezonskog karaktera (Mioč i sur., 2007). Senzorne karakteristike, kao i prehrambena vrijednost ovise o biokemijskim procesima proteolize, lipolize i glikolize, koji se odvijaju u sirnom tijestu tijekom zrenja. Veća probavljivost polutvrdih i tvrdih sireva koji dugo zriju pripisuje se većoj koncentraciji slobodnih aminokiselina i slobodnih masnih kiselina kratkog i srednjeg lanca koje nastaju spomenutim biokemijskim procesima, navode Lukač Havranek i sur. (2000).

U skupinu hrvatskih autohtonih sireva ubraja se i sir iz mišine čija je glavna karakteristika anaerobno zrenje u janjećoj koži (takozvanoj mišini ili mješini) (Tudor Kalit, 2012), čime dodatno do izražaja dolaze poželjna organoleptička svojstva, posebice specifični miris i pikantni slani okus (Grbavac, 2010; Kaić i sur., 2011). S obzirom na udio vode u bezmasnoj tvari i udio mliječne masti, sirevi koji zriju u životinjskoj koži pripadaju skupini

polutvrdih ili tvrdih masnih sireva, ističu Tudor Kalit i sur. (2010). Proteoliza kao najsloženiji i najvažniji biokemijski proces koji se odvija u sirnom tijestu tijekom zrenja doprinosi formiranju karakteristične arome i teksture sira iz mišine. Sukladno navedenom, ispitivanje fizikalno-kemijskih svojstava ovčjeg mlijeka i sira iz mišine te procjena proteolitičkih i teksturnih promjena sira iz mišine tijekom zrenja u cilju njegove karakterizacije kao autohtonog hrvatskog sira, glavni su ciljevi ovog diplomskog rada.

1.1 Cilj istraživanja

Cilj je ovog istraživanja prikazati fizikalna svojstva i kemijski sastav ovčjeg mlijeka za sirenje te sira iz mišine. Povrh toga prikazati će se proteolitičke i teksturne promjene tijekom zrenja sira iz mišine u cilju njegove karakterizacije kao autohtonog hrvatskog sira.

2. Pregled dosadašnjih istraživanja

2.1 Kazeinska micela i mehanizmi koagulacije mlijeka

Kazein je najsloženiji i najzastupljeniji protein mlijeka koji je osjetljiv na djelovanje kiseline ili enzima, a u mlijeku se nalazi u obliku kazeinskih micela prosječnog promjera 150 nm (Tratnik i Božanić, 2012; Havranek i sur., 2014). Organski dio micela (92 %) čine polimerizirane kazeinske frakcije, α_{s1} -CN, α_{s2} -CN, β -CN i k-CN koje se sintetiziraju u mliječnoj žlijezdi, te γ -CN koji je rezultat proteolize β -CN djelovanjem plazmina (Gubić, 2016). Sve su kazeinske frakcije zahvaljujući različitom aminokiselinskom sastavu vrlo reaktivne i podložne interakcijama na bazi hidrofobnih, elektrostatskih, vodikovih i disulfidnih veza (Tratnik i Božanić, 2012). Frakcije α_{s1} -CN i α_{s2} -CN sadrže najviše fosfoserinskih ostataka koji nastaju fosforilacijom hidroksilnih skupina serina zbog čega su vrlo senzibilne na Ca^{2+} ione. Budući da jedino α_{s2} -CN i k-CN sadrže po dva ostatka cisteina, jedino oni tvore kovalentne disulfidne mostove. k-CN je glikoprotein heterogene strukture čiji je N-terminalni dio (1-105 AK) hidrofobne, a C-terminalni dio (106-169 AK) hidrofilne prirode jer sadrži vezane ugljikohidrate (galaktozu, N-acetilneuraminsku kiselinu i N-acetilgalaktozamin), a trodimenzionalna građa k-CN nalik je konju s jahačem. Hidrofobni dijelovi kazeinskih frakcija usmjereni su prema unutrašnjosti micela, dok su hidrofilni dijelovi usmjereni prema njezinom vanjskom dijelu. Slijedom navedenog, na površini micela locirane su molekule k-CN između kojih se nalaze hidrofilni ostaci ostalih kazeinskih frakcija (Tratnik i Božanić, 2012). Prosječno 8 % kazeinske micela čini anorganski dio sastavljen od kalcija, anorganskog fosfora, magnezija i citrata. Od ukupne količine kalcija u miceli, 1/3 je vezana na fosfoserinske ostatke, a ostatak (2/3) se nalazi u obliku koloidnog kalcijevog fosfata, $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6$. Važno je napomenuti kako je kazeinska micela neto-negativnog naboja, što je uzrokovano većim brojem slobodnih karboksilnih skupina ($-\text{COO}^-$) u odnosu na amino skupine ($-\text{NH}_3^+$) (Tratnik i Božanić, 2012), tj. većim brojem glutaminske i asparginske kiseline te fosfoserinskih ostataka (Havranek i sur., 2012). Tratnik i Božanić (2012) objašnjavaju kako je kazeinska micela, zbog većeg udjela prolina, otvorene strukture i kao takva podložna proteolitičkim promjenama. Nadalje, randman sira, ali i njegova kvaliteta izravno ovise o udjelu i cjelovitosti kazeina, ističu Havranek i sur. (2014)

Razlikujemo tri mehanizma koagulacije mlijeka: 1. izoelektričnom precipitacijom kazeina, 2. upotrebom sirila 3. primjenom toplinske obrade mlijeka uz dodatak neke organske kiseline. Mehanizam kisele koagulacije podrazumijeva pad pH-vrijednosti uslijed stvaranja H^+ iona koji se vežu na negativne naboje na miceli kazeina pri čemu se smanjuje elektrostatski potencijal tj. elektronegativnost kazeinske micela. Kada se broj pozitivnih i negativnih naboja izjednači (neutralna čestica) kazein precipitira (pH=4,6). Pri padu pH-vrijednosti s 6,6 na 5,2 dolazi do disocijacije koloidnog kalcijevog fosfata, a zakiseljavanje sa pH=5,2 na pH=4,6 uvjetuje disocijaciju kalcija s fosfoserinskih ostataka (Havranek i sur.,

2014). Drugim riječima, demineralizacija kazeinske micela uvjetuje njezinu destabilizaciju (Kalit, 2013). Mehanizam koagulacije mlijeka djelovanjem sirila uključuje tri faze koje se odvijaju sukcesivno (Bijeljac i Sarić, 2005; Havranek i sur., 2014). Prva faza obuhvaća hidrolizu peptidne veze u molekuli k-CN između Phe₁₀₅ i Met₁₀₆ pri čemu nastaje fragment f 1-105 (para-k-kazein) i fragment f 106-169 (kazeinomakropeptid ili glikomakropeptid). N-terminalni hidrofobni dio k-CN ostaje vezan za kazeinsku micelu, dok C-terminalni hidrofilni dio prelazi u sirutku (Dalglish, 1994; Lucey, 2009; Rako, 2016). Depilacijom kazeinske micela smanjuje se njezin elektrostatski potencijal (Havranek i sur., 2014) te nakon što hidrolizira 90 % k-CN (Ramkumar, 1997; Rako, 2016) slijedi agregacija tako destabiliziranih micela koje se u fazi retikulacije međusobno povežu preko Ca²⁺ iona (Havranek i sur., 2014). U tom je smislu značajno napomenuti kako se u sirarstvu ne preporuča visoka toplinska obrada mlijeka pri kojoj dolazi do denaturacije β-laktoglobulina i njegove interakcije s k-CN, čime je otežan pristup kimoza specifičnom mjestu cijepanja, a što direktno umanjuje koagulacijska svojstva mlijeka (Kalit, 2015). Zagrijavanje mlijeka na visoku temperaturu uz dodatak organske kiseline treći je način koagulacije mlijeka kojim se ostvaruje i najveći randman. Slijedom navedenog, kiselom koagulacijom se dobivaju kiseli sirevi i kisela sirutka (progresivna disocijacija Ca i P iz micela u vodenu fazu), a enzimatskom koagulacijom se dobivaju slatki (sirišni) sirevi i slatka sirutka (prijelaz ugljikohidrata iz micela u vodenu fazu) (Havranek i sur., 2012).

2.2 Biokemijski procesi tijekom zrenja sira

Tijekom zrenja sireva dolazi do biokemijskih promjena u kojima iz složenih organskih molekula (proteina, mliječne masti i laktoze) posredstvom različitih enzima nastaju jednostavnije, te uzročno-posljedično, sir poprima poželjna ili nepoželjna svojstva (Kalit, 2002; Kalit, 2015). Mikulec i sur. (2010) objašnjavaju kako se biokemijske promjene mogu podijeliti na primarne i sekundarne. Primarne biokemijske promjene su proteoliza, lipoliza i glikoliza, a odgovorne su za formiranje poželjne teksture, dok sekundarne promjene podrazumijevaju katabolizam aminokiselina i slobodnih masnih kiselina, čime se formira specifična aroma sira. Osim biokemijskih promjena, u siru se tijekom zrenja odvijaju i mikrobiološke promjene koje uključuju rast nestarterske mikrobne populacije i lizu (odumiranje) bakterija mliječne kiseline dodanih u formi kulture, pri čemu se oslobađaju unutarstanični enzimi (Williams i sur., 2002; Kenny i sur., 2006; Hickey i sur., 2007; Mikulec, 2010).

Proteoliza, lipoliza i glikoliza glavni su biokemijski procesi koji se tijekom zrenja odvijaju u siru djelovanjem enzima sirila, endogenih enzima mlijeka, enzima bakterija mliječne kiseline dodanih u formi kulture te enzima nestarterskih bakterija mliječne kiseline (Havranek i sur., 2014). Tri navedena biokemijska procesa uzrokuju fizikalno-kemijske

modifikacije u siru (Lukač Havranek i sur., 2000; Prieto i sur., 2002; McSweeney, 2004; Tudor Kalit, 2012). Budući da su kazein i mliječna mast dominantne komponente suhe tvari sira, biokemijske reakcije odvijaju se upravo na njima (Fox i sur., 2000a; Tudor Kalit, 2012).

Kako bi se biokemijski procesi mogli odvijati u smjeru tvorbe poželjne arome i teksture, bitan je kemijski sastav sira (udio vode i soli te pH-vrijednost) te odgovarajući mikroklimatski uvjeti u zrioni. Temperatura od 12 °C do 15 °C i relativna vlažnost zraka od 70 % do 80 % optimalni su mikroklimatski uvjeti za pravilan tijek zrenja sira (Kalit, 2015). Budući da je odnos između povećanja temperature i aktivnosti enzima upravo proporcionalan, regulacijom temperature može se utjecati na brzinu zrenja sira. Osim navedenog, bitna je i redovita kontrola i njega sireva koja uključuje okretanje, četkanje, brisanje, struganje i premazivanje sireva (Tratnik i Božanić, 2012; Kalit, 2015).

Presudnu ulogu u razvoju specifične arome autohtonih sireva imaju enzimi nestarterskih bakterija mliječne kiseline (Kalit, 2002), većina kojih u sir dopijeva iz sirovog mlijeka (Casey i sur., 2006, Matutinović i sur., 2007), a čiji se broj u istom tijekom zrenja povećava (Kalit, 2002). Havranek i sur. (2014) navode kako je broj NSLAB-a u sirevima proizvedenima od sirovog mlijeka oko 10^8 cfu/g, dok je u sirevima od pasteuriziranog mlijeka njihov broj oko 10^7 cfu/g.

2. 3. 1. Glikoliza

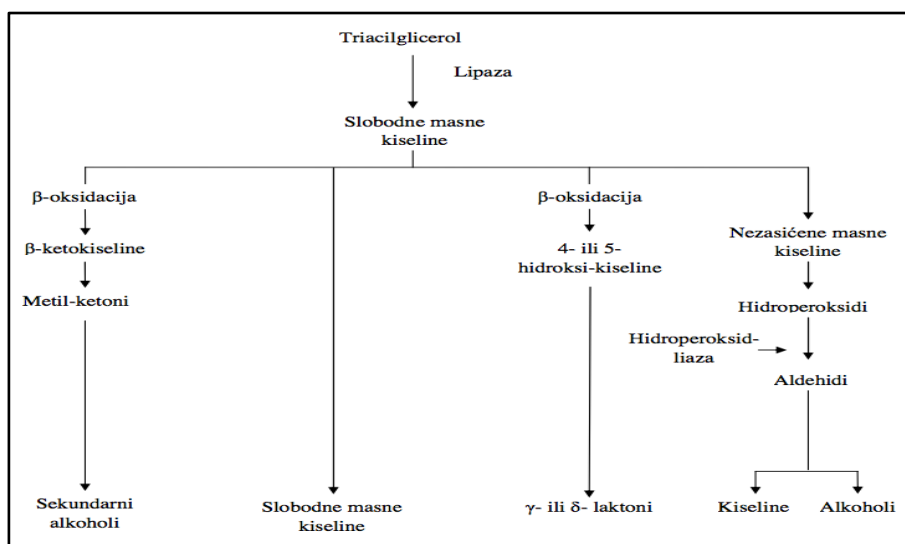
Bakterije mliječne kiseline laktozu u stanicu unose u fosforiliranom obliku pomoću ATP-ovisnog laktoza permeaznog sustava ili fosfoenolpiruvat-ovisnog-fosfotransferaznog sustava, a razgradnja se provodi glikolitičkim (Embden-Mayerhof-Parnasovim putem) ili fosfoketolaznim putem, ovisno o tome govori li se o homofermentativnim ili heterofermentativnim vrstama bakterija mliječne kiseline. U stanici se laktoza-6P djelovanjem β -galaktozidaze hidrolizira na glukozu i galaktozu-6P. Glukoza se glikolitičkim putem prevodi do piruvata iz kojeg djelovanjem laktat-dehidrogenaze nastaje laktat, dok se galaktoza razgrađuje Leloirovim ili Tagatoznim putem, objašnjava Samaržija (2015). Bijeljac i Sarić (2005) navode kako se konverzija laktoze u mliječnu kiselinu provodi djelovanjem dodanih kultura bakterija mliječne kiseline ili djelovanjem NSLAB-a. U proizvodnji sira dolazi do izdvajanja sirutke te dobiveni gruši sadrži oko 1-2 % laktoze, 98 % iste gubi se sirutkom. Sva laktoza zaostala u grušu konvertira se u L-izomer mliječne kiseline (Havranek i sur., 2014), djelovanjem enzima starterske i nestarterske mikrobiote (Fox i McSweeney, 1998; Tudor Kalit, 2012), a čija sudbina ovisi o vrsti sira. Kod švicarskih sireva tipa ementalca i grojera djelovanjem *Propionibacterium spp.* iz laktata nastaje octena i propionska kiselina te CO₂ i H₂O, dok u Cheddaru i nizozemskim sirevima iz L-izomera nastaje racemična smjesa L/D laktata. Kod sireva s plemenitim plijesnima i sireva s mazom laktat se djelovanjem površinske plijesni i kvasaca metabolizira do CO₂ i H₂O što uzrokuje porast pH-vrijednosti i bolji rast

bakterije *Brevibacterium linens*. Većina sireva ima pH-vrijednost od 4,6 do 5,2, što je rezultat produkcije laktata, a koja se tijekom zrenja povećava (Havranek i sur., 2014).

2. 3. 2. Lipoliza

Mliječna mast kompleks je različitih lipidnih tvari, od kojih su najviše zastupljeni triacilgliceroli (98,30 %) te u manjoj količini diacilgliceroli, monoacilgliceroli, fosfolipidi, slobodne masne kiseline, kolesterol, cerebrozidi, vitamini A, D, E i K, mineralne tvari i drugi spojevi (Tratnik i Božanić, 2012). U mliječnoj masti identificirano je i opisano više od 400 masnih kiselina od kojih 70 % čine zasićene masne kiseline i 30 % nezasićene masne kiseline, odnosno 27 % mononezasićenih masnih kiselina i 3 % polinezasićenih masnih kiselina. Mliječna mast dobar je izvor esencijalnih polinezasićenih masnih kiselina, linolne, linolenske i arahidonske kiseline (Tratnik i Božanić, 2012; Samaržija, 2015).

Mliječna je mast podložna lipolitičkim i oksidativnim promjenama. Lipolitičke promjene podrazumijevaju cijepanje esterskih veza u triacilglicerol molekulama pri čemu nastaje alkohol glicerol i slobodne masne kiseline (Collins i sur., 2003, Tudor Kalit, 2012) koje su podložne oksidaciji, odnosno, vezanju kisika iz zraka na dvostruke kovalentne veze nezasićenih masnih kiselina, navode Antunac i Havranek (2013). Međutim, zbog niskog oksidacijsko-redukcijskog potencijala u siru, mliječna je mast više podložna lipolitičkim nego oksidativnim promjenama (Collins i sur., 2003, Tudor Kalit, 2012). U odnosu na kravlje i kozje, u ovčjim se sirevima zbog većeg udjela mliječne masti odvijaju intenzivnije lipolitičke promjene tijekom zrenja (Larreyoz i sur., 2002; Pinho i sur., 2003; Tudor Kalit, 2012).



Slika 2.1. Katabolizam slobodnih masnih kiselina (McSweeney i Sousa, 2000)

Kratkolančane i srednjelančane masne kiseline, kao što su maslačna, kapronska i kaprilna kiselina, imaju izravan utjecaj na kreiranje arome sira, dok su dugolančane masne kiseline prekursori za biosintezu sekundarnih metabolita poput metil-ketona, sekundarnih alkohola, γ - ili δ -laktone te kiseline i alkohola (Tudor Kalit, 2012). Katabolizam slobodnih masnih kiselina prikazan je na slici 2.1.

2. 3. 3. Proteoliza

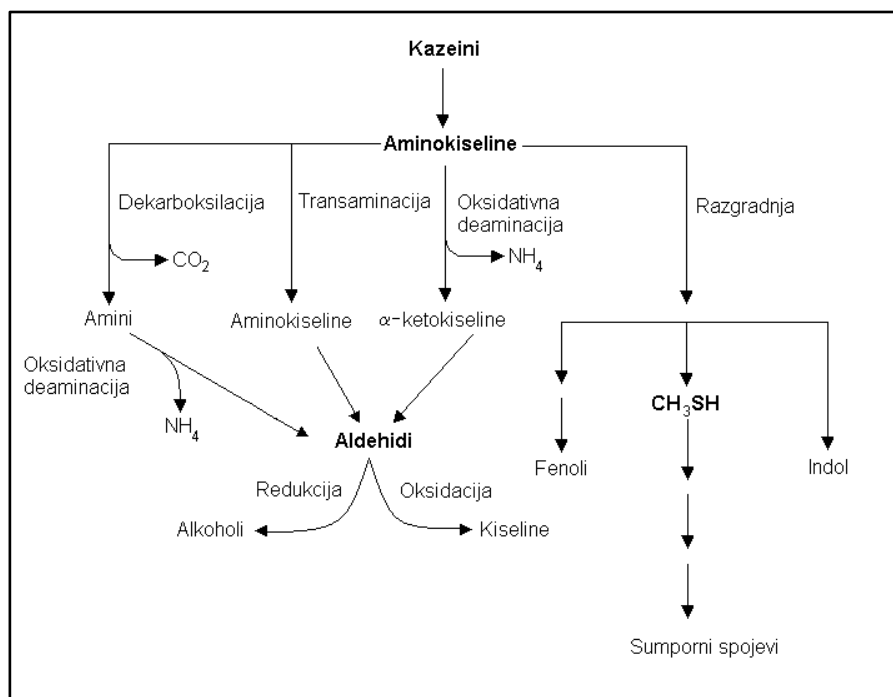
Proteoliza podrazumijeva razgradnju kazeina do peptida i slobodnih aminokiselina djelovanjem proteolitičkih enzima koji potječu iz mlijeka (endogeni enzimi), sirila, mljekarske kulture (LAB), naknadnog ili sekundarnog startera te nestarterske mikrobnje populacije (NSLAB) (McSweeney i Fox, 1999, Mikulec i sur., 2010). Reakcija proteolize obuhvaća tri faze: proteoliza u mlijeku, proteoliza za vrijeme enzimske koagulacije mlijeka i proteoliza za vrijeme zrenja sireva (Fox, 1989). Proteoliza je ujedno najvažniji i najsloženiji biokemijski proces koji se odvija u siru tijekom zrenja (Havranek i sur., 2014). Proteolitički se enzimi s obzirom na mjesto napada na proteinu dijele na endopeptidaze i egzopeptidaze. Endopeptidaze cijepaju peptidne veze u sredini polipeptidnog lanca, dok egzopeptidaze odcjepljuju krajnje aminokiseline pa među njima razlikujemo karboksipeptidaze i aminopeptidaze (Karlson, 1993).

U osnovi razlikujemo primarnu proteolizu, koja se odvija djelovanjem kimozina i plazmina, te sekundarnu proteolizu, koja se odvija djelovanjem endogenih i egzogenih enzima nestarterske populacije i bakterija mliječne kiseline dodanih u formi startera. Primarna proteoliza podrazumijeva hidrolizu kazeina do određenih razgradnih produkata (Benfeldt, Sorensen, Ellegard, & Petersen, 1997; Kalit i sur., 2004) i najviše ovisi o količini i aktivnosti rezidualnog sirila, a u manjoj mjeri o aktivnosti plazmina (Bansal i sur., 2007; Rako, 2016). Sekundarna proteoliza podrazumijeva razgradnju proteina i velikih peptida do aminokiselina i malih peptida (Addeo i sur., 1992; Gagnaire, Thierry & Leonil, 2001; Kalit i sur., 2004). Viša temperatura zrenja, duži vremenski period zrenja, više rezidualnog sirila, veći aktivitet vode te manji udio soli uzroci su intenzivnije proteolize u siru (Tratnik, 1998; Tudor Kalit, 2012).

Od ukupne količine sirila koje koristimo u proizvodnji, od 3 do 10 % ostaje ugrađeno u sirno tijesto, a tijekom zrenja djeluje na α_{s1} -CN (Havranek i sur., 2014) i na taj način doprinosi senzorskim karakteristikama (Mikulec, 2010). Najveća aktivnost kimozina u siru je pri pH=5 (Walstra i sur., 2006; Rako, 2016). Produkti razgradnje su fragment f 1 – 23 (predstavlja supstrat za sekundarnu proteolizu), α_{s1} – I (f 24 – 199) i α_{s1} –II (f 24 – 169). Nastajanje tih peptida posebno je važno u prvim tjednima zrenja za omekšavanje gumene i elastične mase sira. Međutim, dodavanje prevelike količine sirila u mlijeko uvjetuje hidrolizu hidrofobnih dijelova kazeina pri čemu nastaju gorki peptidi. Plazmin je alkalna proteinaza vezana na micelu kazeina preko lizinskih ostataka β -CN. Produkti djelovanja plazmina na β -

CN su fragmenti γ_1 -CN (β -CN f 29 – 209), γ_2 -CN (β -CN f 106 – 209) i γ_3 -CN (β -CN f 108 – 209) te proteoze peptoni: PP8 brzi (β -CN f 1 – 28), PP8 spori (β -CN f 29 – 105/107) i PP5 (β -CN f 1 – 105) (Havranek i sur., 2014). Samaržija (2015) objašnjava kako je za normalan rast stanica bakterija mliječne kiseline potrebna određena koncentracija slobodnih aminokiselina. Budući da je mlijeko siromašno slobodnim aminokiselinama ($<1\text{mgL}^{-1}$) te je limitiran kapacitet bakterija mliječne kiseline za vlastitu biosintezu, one su kroz evoluciju razvile vlastiti proteolitički sustav (enzimatski sustav) razgradnje proteina mlijeka. Međutim, proteolitička aktivnost bakterija mliječne kiseline vrlo je slaba i nadovezuje se na primarnu proteolizu (Havranek i sur., 2014).

Produkti sekundarne proteolize su niskomolekularni peptidi koji se konvertiraju do aminokiselina, a iz kojih biokemijskim procesima dekarboksilacije, deaminacije, transaminacije i desumporizacije nastaju aromatske komponente. U biokemijskom smislu, dekarboksilacija podrazumijeva uklanjanje karboksilne skupine pri čemu nastaje ugljikov dioksid i primarni amin (Karlson, 1993), a najvažniji amini sira su tiramin i histamin koji nastaju dekarboksilacijom tirozina i histidina (Havranek i sur., 2014) djelovanjem histidin i tiramin dekarboksilaze (Jelovac i sur., 2011). Transaminacija je proces u kojem se amino grupa djelovanjem transaminaza prenosi na 2-oksoglutarat ili oksalacetat pri čemu nastaje 2-oksokiselina, koja sadrži raspored C-atoma aminokiseline. Pri deaminaciji najprije nastaje iminokiselina, koja hidrolizom daje α -ketokiselinu i amonijak (Karlson, 1993). Iz nastalih α -ketokiselina, aminokiselina i amina nastaju aldehidi koji se ne akumuliraju u siru već oksidiraju do kiselina ili reduciraju do alkohola (Havranek i sur., 2014) što je prikazano na slici 2.2. Autori nadalje navode kako su metantioi, sumporovodik, dimetilsulfid, dimetildisulfid, dimetiltrisulfid i karbonilsulfid najvažniji niskomolekularni sumporni spojevi koji nastaju desumporizacijom metionina i cistina. Nadalje, treba istaknuti i katabolizam aromatskih aminokiselina djelovanjem enzima mikrobnih kultura i nestarterskih bakterija mliječne kiseline pri čemu također nastaje široka lepeza molekula nosioca okusa. Aminokiseline koje služe kao prekursori u produkciji aromatskih spojeva su one s razgranatim lancem: valin, leucin, izoleucin; aromatske aminokiseline: fenilalanin, tirozin i triptofan te aminokiseline koje sadrže sumpor: metionin i cistin (Havranek i sur., 2014).

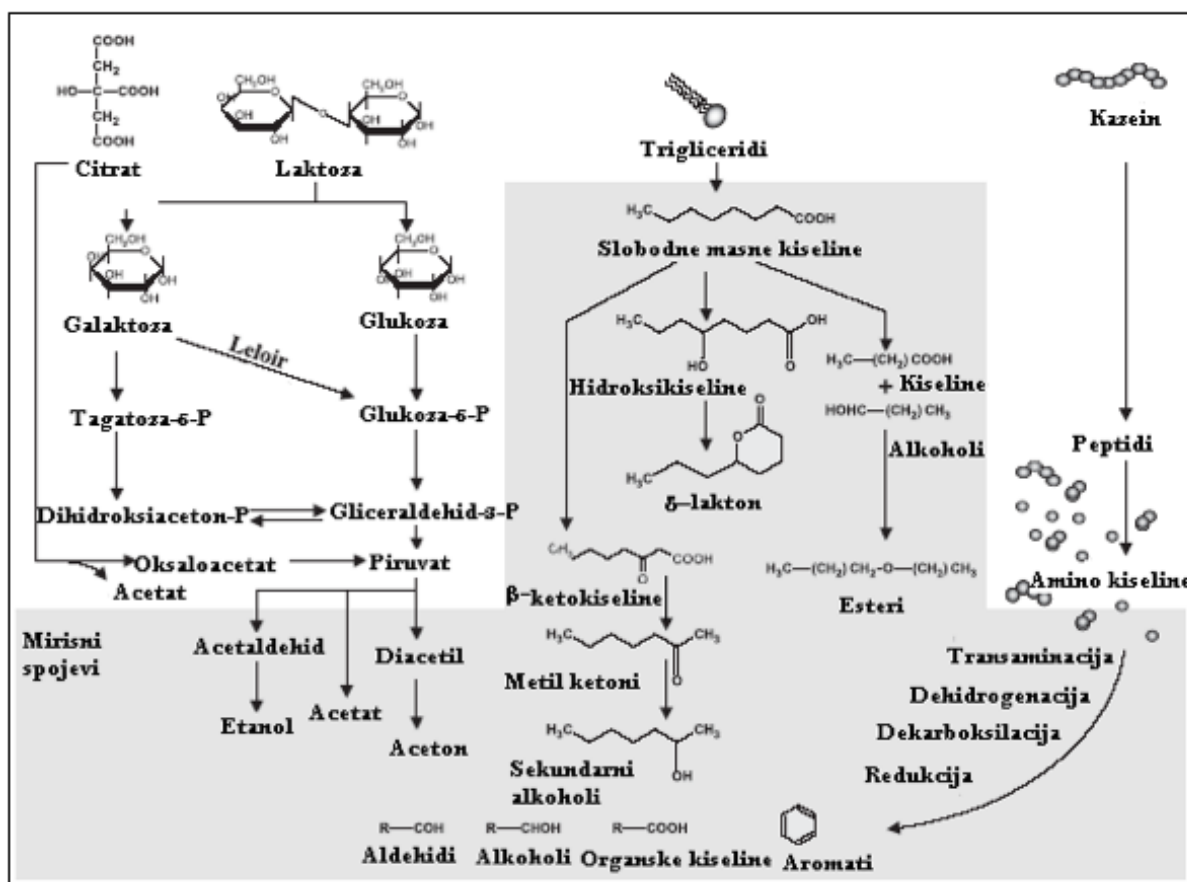


Slika 2.2. Opći putovi katabolizma slobodnih aminokiselina (Izvor: McSweeney i Sousa, 2000)

2.3 Teorija balansnih spojeva

Organoleptičke karakteristike različitih vrsta sireva na početku zrenja vrlo su slične, a specifična se aroma formira tijekom perioda zrenja, objašnjavaju Mikulec i sur. (2010). Razvoj arome i teksture sira ovisi o biokemijskoj degradaciji mliječnih komponenata, uključujući kazeine, mliječnu mast, laktozu, laktat i citrat pri čemu nastaje široka paleta aromatskih razgradnih produkata (slika 2.3). Za razvoj arome (karaktera) sira zaslužni su brojni spojevi, ali nijedan pojedinačni spoj nema dominantnu ulogu u tehnologiji razvoja okusa. Karakteristična aroma ovisi o brojnim spojevima te o njihovim specifičnim omjerima i koncentracijama, a taj koncept poznat je pod nazivom teorija balansnih spojeva (engl. Component Balance Theory), objašnjavaju Fuquay i sur. (2011), a koja je predložena pedesetih godina prošlog stoljeća (Havranek i sur., 2014). Karakter siru daju kemijski spojevi topljivi u vodi (peptidi, aminokiseline, masne kiseline kratkog lanca, organske kiseline i NaCl) i hlapljivi aromatski spojevi, objašnjavaju Havranek i sur. (2014), a koji nastaju procesom zrenja, ističu Kulić i sur. (1991). Sukladno tome, Mikulec i sur. (2010) navode zrenje sira kao ključnu tehnološku operaciju u procesu proizvodnje polutvrđih i tvrdih sireva. Kod autohtonih sireva, aroma se formira znatno brže zbog prisutnih nestarterskih bakterija mliječne kiseline i endogenih enzima (Fox i McSweeney 1998; Delgado i sur.,

2011). Glavni biokemijski proces koji najviše doprinosi nastajanju arome kod sireva koji zriju u životinjskoj koži jest lipoliza (Molkentin, 2000; Tudor Kalit, 2012).



Slika 2.3. Biokemijski procesi nastajanja spojeva okusa i arome sira (Izvor: Marilley i Casey, 2004; Mikulec, 2010)

2.4 Tekstura sireva

Samaržija (2015) definira teksturu kao skupinu fizikalnih svojstava koja proizlaze iz strukturnih elemenata, a koja se mogu osjetiti dodirrom, podložna su deformacijama i tečenju i mogu se mjeriti kao funkcija mase, vremena i udaljenosti. Mjerenje teksture sireva temelji se na njegovim reološkim karakteristikama (Le Quéré i Cayot, 2013, Rako, 2016). Reologija je znanstvena disciplina koja proučava deformacije i tečenje tvari u čvrstom (krutom), tekućem i plinovitom agregatnom stanju kada na njih djelujemo vanjskom silom (Samaržija, 2015). Pojam deformacije podrazumijeva promjenu oblika i dimenzija proizvoda (Lovrić, 2003) dok

pojam tečenja predstavlja reorganizaciju sastojaka hrane pod utjecajem vanjske sile (Ritzoulis, 2013, Rako, 2016). U reološka svojstva ubrajaju se viskoznost, elastičnost, viskoelastičnost, čvrstoća i kohezivnost (Samaržija, 2015). Viskoznost se definira kao otpor koji tekućina pruža promjeni položaja (Lovrić, 2003), a može se opisati i kao dodana energija koja je u materijalu raspršena u obliku topline, dok je kod elastičnosti sva dodana energija sadržana u materijalu (Samaržija, 2015). Visokoelastični materijali pokazuju svojstva i čvrstih i tekućih materijala (Lovrić, 2003) tj. svojstva i viskoznosti i elastičnosti, dok kohezivnost čini granicu do koje se neki materijal može deformirati prije nego što pukne, navodi Samaržija (2015).

Pri mjerenju teksture, prednost se zbog točnijih rezultata daje cilindričnom obliku uzorka sira (Rohm i Jaros, 2002), iako se mogu koristiti i uzorci sira u obliku kocke (Fox i sur., 2000b). Na teksturne karakteristike sira utječe kemijski sastav mlijeka iz kojeg je sir proizveden, tehnološki postupci u proizvodnji te mikroklimatski uvjeti tijekom zrenja (Lucey i sur., 2003, Rako, 2016). Havranek i sur. (2014) objašnjavaju kako je za kvalitetu i količinu sira važan udio proteina i mliječne masti u mlijeku za sirenje te njihova cjelovitost. Odnos između udjela mliječne masti u mlijeku za sirenje i proteina u suhoj tvari sira (Fenelon i Guinee, 1999; Sánchez-Macías i sur., 2010) obrnuto je proporcionalan čime se značajno utječe na teksturne karakteristike sira (Fenelon i Guinee, 1999 i Lteif i sur., 2009). Slijedom navedenog, sirevi proizvedeni od obranog ovčjeg mlijeka imaju veću čvrstoću u odnosu na sireve proizvedene od punomasnog mlijeka (Irigoyen i sur., 2002). Nadalje, obrnuto je proporcionalan odnos između viskoznosti i udjela vode u siru (Fox i sur., 2000b; McSweeney, 2000).

Rako (2016) ističe povezanost pH-vrijednosti, udjela kalcija, soli i vode s teksturom sira. Bakterije mliječne kiseline iz sastava mliječarske kulture laktozu koriste kao izvor energije koju konvertiraju u mliječnu kiselinu koja uzrokuje pad pH-vrijednosti (Walstra i sur., 2006) čime se povećava aktivnost kimoizina i disocijacija koloidnog kalcijevog fosfata, a smanjuje hidratacija i elektronegativnost kazeinske micelle (Maćej i sur., 2007). Sirevi dobiveni od mlijeka čija je pH-vrijednost 6,1 imaju manju čvrstoću u odnosu na sireve dobivene koagulacijom mlijeka pH-vrijednosti od 6,5 do 6,7 (Ong i sur., 2012; Rako, 2016). Odnos između pH-vrijednosti sira i udjela vode u siru upravo je proporcionalan te će uzročno-posljedično u sir pri nižoj kiselosti difundirati veća koncentracija natrij-klorida tijekom salamurenja (Guinee, 2004), čime se direktno utječe na proteolitičke promjene djelovanjem rezidualnog sirila (Guinee i Fox, 2004).

2.5 Povezanost proteolize i teksture sira

Proteoliza, osim što doprinosi nastajanju arome sira (McSweeney i Sousa, 2000) odgovorna je, izravno, hidrolizom trodimenzionalne proteinske mreže i smanjenjem aktiviteta

vode, i neizravno, povećanjem pH-vrijednosti, za karakterističnu teksturu sira (Upadhyay i sur., 2004; Rako, 2016). Teksturane promjene koje se u siru odvijaju tijekom zrenja djelovanjem rezidualnog sirila mogu se podijeliti u dva vremenska razdoblja. Prvo razdoblje odnosi se na dva tjedna od proizvodnje u kojem kimozin brzo hidrolizira α_{s1} -CN što dovodi do omekšavanja teksture sirnog tijesta. Pri 20 %-tnoj hidrolizi α_{s1} -CN mekša tekstura sira može se osjetiti na dodir. U drugom je razdoblju aktivnost kimozina puno manja, ali je veća aktivnost plazmina te enzima starterske i nestarterske mikrobne populacije, uslijed čega dolazi do povećanja pH-vrijednosti (Creamer i Olson, 1982; Hort i Grys, 2001; Puđa, 2009; Rako, 2016).

Rako (2016) objašnjava kako intenzitet proteolize tijekom zrenja ovisi o količini, vrsti i aktivnosti rezidualnog sirila i plazmina iz mlijeka, omjeru mliječne masti i proteina u siru, temperaturi zrenja, udjelu vode i soli u siru te koncentraciji uree. Odnos između rezidualnog sirila i njegove količine dodane u mlijeko upravo je proporcionalan (Johnston i sur., 1994; Fox i sur., 2000b). Nadalje, udio rezidualnog sirila ovisi i o pH-vrijednosti mlijeka za sirenje. Značajno se povećava udio sirila u grušu ako je pH-vrijednost mlijeka manja od 6,1 (Bansal i sur. 2007; Rako, 2016), što uzrokuje manju čvrstoću sira (Ong i sur., 2012; Rako, 2016). Aktivnost kimozina i plazmina ovisi i o temperaturi dogrijavanja sirnog zrna (van den Berg i Exterkate, 1993; Rako 2016). Pri dogrijavanju sirnog zrna do temperature 52-54 °C, što se primjenjuje u proizvodnji Ementalca, smanjuje se aktivnost kimozina, a povećava aktivnost (Fröhlich-Wyder i Bachmann, 2004; Rako, 2016) termostabilnog plazmina (Kalit i sur., 2002). Nadalje, kimozinska i plazminska aktivnost ovise o pH-vrijednosti sira. Sukladno tome, u Cheddar siru čiji je pH=5 veća je aktivnost kimozina, dok Ementalc, čiji je pH=5,4-5,7 ima jače izraženu plazminsku aktivnost (Puđa, 2009; Rako, 2016). Usporedbom različitih vrsta sirila utvrđena je veća proteolitička aktivnost sirila biljnog podrijetla u odnosu na životinjska sirila (Sousa i Malcata, 1997; Rako, 2016), dok su An i sur. (2014) utvrdili veću aktivnost sirila mikrobiološkog podrijetla u odnosu na životinjska sirila. Nadalje, što sirevi imaju veći udio mliječne masti, intenzivnije su primarne proteolitičke promjene što smanjuje čvrstoću Cheddar sira (Guinee i sur., 2000). Intenzivnija proteoliza i veći gubitak vode tijekom zrenja u pozitivnoj su korelaciji s povećanjem temperature zrenja (van den Berg i Exterkate, 1993) dok je obrnuto proporcionalan odnos između udjela vode u siru i napona lomljivosti (Gunasekaran i Ak, 2003; Rako, 2016). Udio slobodne vode tijekom zrenja sira smanjuje se zbog vezivanja na karboksilne i amino skupine uslijed čega dolazi do povećanja pH-vrijednosti sira (Havranek i sur., 2014). Intenzitet primarne proteolize ovisi i o koncentraciji soli u siru. Udio soli od 5 % potiče kimozinsku aktivnost na razgradnju α_{s1} -CN (Guinee i Fox, 2004; Rako, 2016). Koncentracija uree u siru prvenstveno ovisi o njezinoj koncentraciji u mlijeku i o trajanju zrenja (Vintila i Marcu, 2011), a normalna koncentracija u mlijeku je 10 – 30 mg/100 mL ili 1,7 – 4,5 mmol/L (Marenjak i sur., 2004; Bendelja i sur., 2009). Veća koncentracija uree u mlijeku uzrokuje manji udio cjelovitog (micelnog) kazeina i sukladno tome manji randman (Kalit, 2008; Blažanović, 2015) te veći udio vode i mekaniju teksturu sireva (Martin i sur., 1997; Rako, 2016), a njezina se koncentracija tijekom zrenja smanjuje (Van den Berg i Exterkate, 1993).

Slijedom navedenog, Rako (2016) u svojoj disertaciji zaključuje kako povećanje udjela kazeina, smanjenje udjela mliječne masti te povećanje omjera kazeina i mliječne masti u ovčjem mlijeku, značajno utječe na povećanje čvrstoće bračkog sira.

2.6 Glavne osobitosti sira iz mišine

Sir iz mišine proizvodi se na obiteljskim poljoprivrednim gospodarstvima u okolici Knina i Drniša iz sirovog ovčjeg mlijeka bez korištenja mikrobnih kultura, uz dodatak industrijskog sirila i prema tehnologiji proizvodnje polutvrdog sira (Tudor Kalit, 2012; Kaić i sur., 2011). Iako se autohtonim sirom iz mišine smatra sir proizveden iz mlijeka autohtone pasmine ovaca Dalmatinske pramenke, proizvodi se i iz kravljeg i kozjeg mlijeka, ili iz njihovih mješavina. Prema literaturnim podacima, početak proizvodnje ovog sira datira još iz doba Ilira i Tračana, čije su ovce pasle na pašnjacima Dinare, objašnjava Tudor Kalit (2012). Ti su narodi za spremanje i transport sira iz planine u dolinu koristili mišinu. Sir iz mišine proizvodi se i danas na desetak obiteljskih poljoprivrednih gospodarstava Šibensko-kninske županije (Tudor Kalit, 2014) gdje se uzgaja oko 200 000 ovaca pasmine dalmatinska pramenka, a čije se mlijeko koristi za proizvodnju ovog sira. Godišnja proizvodnja ovog sira na obiteljskim poljoprivrednim gospodarstvima iznosi 5 do 10 tona, ističu Kaić i sur. (2008). Osim u Republici Hrvatskoj, proizvodnja sireva koji zriju u životinjskoj koži zastupljena je u Bosni i Hercegovini (sir iz mijeha), Crnoj Gori (sir iz mijeha), Turskoj (Tulum sir) i Libanonu (Darfijeh) (Tudor Kalit, 2012). Od sireva koji zriju u životinjskoj koži, najviše je istražen Tulum sir čija je tehnologija proizvodnje najbližnja proizvodnji hrvatskog sira iz mišine (Yilmaz i sur., 2005; Hayaloglu i sur., 2007a i b; Serhan i sur., 2007; Cakmakci i sur., 2011; Serhan i sur., 2010; Hayaloglu i sur., 2013a i b; Vrdoljak, 2016).

Tehnologiju tradicionalne proizvodnje sira iz mišine prvi su opisali Tejkal 1913. godine (Vrdoljak, 2016) i Filipović 1938. godine, navode Kaić i sur. (2011). Millin (1969) je proveo prvo istraživanje sira iz mišine i utvrdio sljedeći kemijski sastav: suha tvar 62,96 %, proteini 24,08 %, mliječna mast 32,92 %, mliječne mast u suhoj tvari 52,50 %, mineralne tvari 5,52 % te sol 4,29 % te ga kategorizirao u skupinu tvrdih punomasnih masnih sireva. Grbavac (2002) u svom magistarskom radu sir iz mješine kategorizira kao tvrdi punomasni sir prosječnog kemijskog sastava kako slijedi: voda 41,04 %, mliječna mast 31,19 %, proteini 21,65 %, mliječna mast u suhoj tvari 53,36 %, mineralne tvari 4,50 i natrij-klorid 3,59 %. Bijeljac i Sarić (2005) sir iz mijeha s područja Hercegovine proizvedenog od punomasnog mlijeka kategoriziraju u skupinu tvrdih sireva sljedećeg kemijskog sastava: <40 % vode, 45 – 55 % masti u suhoj tvari, 25 – 35 % proteina, 4 – 7 % mineralnih tvari, 3 – 5 % soli i 0,7 - 0,9 % mliječne kiseline. Analizirajući fizikalno-kemijski sastav sira iz mišine, Tudor i sur. (2009) utvrdili su sljedeći fizikalno-kemijski sastav zrelog sira iz mišine: suha tvar 66,52 %, mliječna mast 36,3 %, mliječna mast u suhoj tvari 54,30 %, voda u bezmasnoj tvari 52,08 %, proteini

24,92 %, sol 3.08 %, pH=5,35 i mliječna kiselina 1,25 % te ga kategorizira u skupinu tvrdih punomasnih sireva. Grbavac (2010) je fizikalno-kemijskom analizom utvrdio da Planinski sir iz mješine sadrži 38,86 % vode, 31,14 % mliječne masti, 51,93 % mliječne masti u suhoj tvari, 22,16 % proteina, 3,93 % mineralnih tvari i 3,25 % soli čime je svrstan u kategoriju tvrdih punomasnih sireva. U istraživanju prirodne mikrobne populacije sira iz mišine, utvrđena je prisutnost sva tri glavna roda bakterija mliječne kiseline: *Lactococcus*, *Enterococcus* i *Lactobacillus* (Kaić i sur., 2011) od kojih *Lactococcus* spp. i *Enterococcus* spp. imaju važnu ulogu u kreiranju specifičnih senzorskih karakteristika (Mrkonjić Fuka i sur., 2013).

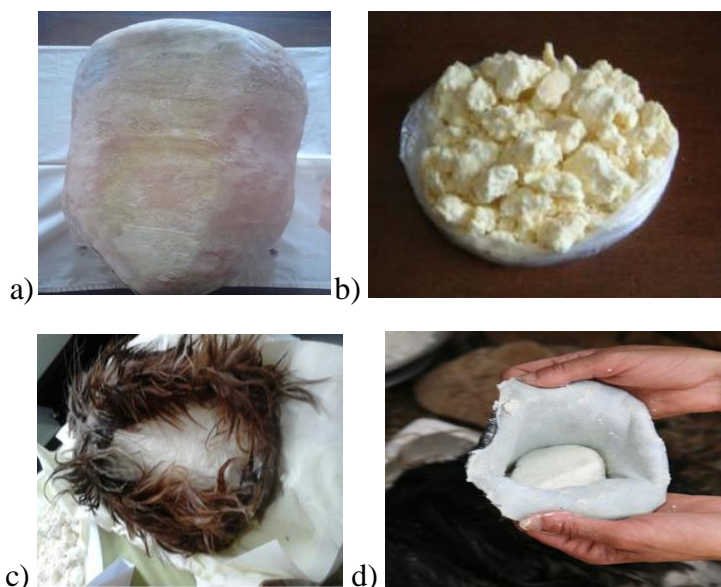
2.7 Tehnologija proizvodnje sira iz mišine

Glavna proizvodna specifičnost sira iz mišine jest zrenje u janjećoj koži (Tudor Kalit, 2009), što ga u potpunosti razlikuje od ostalih sireva (Grbavac, 2010), a što ima izravan utjecaj na okus, aromu, miris i konzistenciju finalnog proizvoda, zaključuju Kaić i sur. (2011). Mišina se može opisati kao „vreća“ napravljena od kože cijelog janjeta ili jareta. Upravo se iz tog razloga velika pozornost pridaje pripremi janjeće mišine u kojoj sir zrije. Janjeću je mišinu, nakon brijanja vune i skidanja loja, potrebno nekoliko puta dobro oprati vodom, te osušiti na vjetru i suncu i dodatno dimiti zbog konzervirajućeg učinka. Prije punjenja, mišina se 30 minuta namače u sirutei i/ili toploj vodi da omekša te se udovi zavežu špagom i tradicionalno dezinficiraju rakijom ili octom. Zatim se tako pripremljena mišina napuše kako bi se provjerilo ima li mehaničkih oštećenja te se puni sirom kroz vratni otvor, objašnjava Tudor Kalit (2010). Značajno je napomenuti vještinu pripreme kože ne bi li se u potpunosti izbjegla moguća mehanička oštećenja koja su kasnije mogući izvor kvarenja sira (Kalit, 2016). Vrdoljak (2016) kao najčešće pogreške do kojih dolazi tijekom pripreme mišine navodi nepravilno skidanje kože, zaostajanje tkiva koji onemogućuju adekvatno sušenje mišine i mehanička oštećenja uslijed brijanja životinjske kože.

Sir iz mišine proizvodi se na obiteljskim poljoprivrednim gospodarstvima Šibensko-kninske županije, uglavnom od ovčjeg mlijeka, ali i od kozjeg i kravljeg mlijeka ili njihovih mješavina. Sirovo se mlijeko radi uklanjanja mehaničkih nečistoća procijedi kroz gazu i temperira na 32 – 37 °C uz dodatak prirodnog ili komercijalnog sirila. Nakon 30 – 60 minuta, koliko traje sirenje, gruš se nožem ili kutljačom reže na kocke veličine 4x4 cm te dogrijava do temperature od 39 °C, nakon čega poprima veličinu lješnjaka ili oraha. Dok je gruš još u sirutei, ručno se oblikuje sirna gruda i stavlja u sirarsku maramu u kojoj se cijedi samoprešanjem. Nakon cijedenja, gruš se reže na komade približne veličine 10x10x15 cm, soli krupnom morskom solju i stavlja u prethodno pripremljenu mišinu, pri čemu je sir u izravnom kontaktu s unutarnjom ili vanjskom stranom kože (Tudor i sur., 2009; Tudor Kalit i sur., 2010, Kaić i sur., 2011). S obzirom da u jednu mišinu stane oko 15-20 kg sira, ako na

dan proizvodnje nema dovoljno sira da se mišina napuni, ista se ostavlja do sutradan kada se napuni novom količinom sira (Kalit, 2016; Vrdoljak, 2016) ističe kako u jednu mišinu stane. Ne bi li se izbjeglo kvarenje sira, Kaić i sur. (2011) obrazlažu kako prilikom stavljanja u mišinu sir treba dobro nabiti kako ne bi ostali prostori ispunjeni zrakom s obzirom na to da se zrenje odvija u anaerobnim uvjetima. Zrenje ovog sira traje 2-3 mjeseca pri temperaturi od 16 °C do 20 °C i relativnoj vlažnosti zraka od 65 % do 80 %, navodi Tudor Kalit (2014), što je sukladno mišljenju Kalita (2002) prema kojem zrenje polutvrdih i tvrdih autohtonih sireva traje od jednog do četiri mjeseca, ovisno o sastavu i veličini sira. Na početku perioda zrenja mišinu napunjenu sirom potrebno je svakodnevno okretati. Stariji se sir okreće svaka 2-3 dana, a zreli sir svakih 5 dana uz brisanje vlažnom krpom radi prevencije pojave plijesni (Bijeljac i Sarić, 2005).

Međutim, postoje određene razlike kada je riječ o tehnologiji proizvodnje sira iz mišine u pet zemalja u kojima se on proizvodi (slika 2.4). Primjerice, u Bosni i Hercegovini sir se nakon cijedenja i soljenja sprema u kacu dok se ne sakupi dovoljna količina za jedan mijeh (aerobna konverzija laktoze u mliječnu kiselinu), zatim se rukama lomi i mrvli i na kraju stavlja u alkoholom dezinficirani mijeh. Sir zrije na temperaturi od 12 °C do 15 °C, što je niže od temperature zrenja u hrvatskoj proizvodnji (Bijeljac i Sarić, 2005; Grbavac, 2002). Tulum sir (Turska) zrije u kozjoj koži 3-6 mjeseci pri temperaturi od 6 °C do 10 °C i relativnoj vlažnosti zraka 65 % do 85 % (Yilmaz i sur., 2005, Tudor Kalit, 2012). Kozji Darfiyeh sir (Libanon) se prije spremanja u kozju kožu oblikuje u loptice mase 400 – 500 g. Sir zrije 1-3 mjeseca pri temperaturi od 10 °C do 12 °C i relativnoj vlažnosti zraka 85 % do 95 % zajedno s albuminskim sirom koji se prije stavljanja u kožu suho soli (Serhan i sur. 2010).



Slika 2.4. a) Sir iz mišine (Izvor: fotografija: D. Petrović); b) sir iz mijeha (Izvor: Bijeljac i Sarić, 2005) c) Tulum sir (Izvor: Vrdoljak, 2016) i d) Darfiyeh sir (Izvor:

<https://slowfoodbeirut.com/ark-of-taste/>)

3. Materijali i metode istraživanja

Za potrebe istraživanja, na obiteljskom poljoprivrednom gospodarstvu u zaleđu Drniša proizvelo se deset šarži ovčjeg sira iz mišine primjenom tradicionalne tehnologije, a uzorkovanje sira provodilo se 0., 15. i 30. dana zrenja. Fizikalno-kemijske analize ovčjeg mlijeka i sira iz mišine određivale su se standardnim metodama u Referentnom laboratoriju za mlijeko i mliječne proizvode Zavoda za mljekarstvo Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, dok se tekstura sira određivala u Institutu za jadranske kulture i melioraciju krša u Splitu.

3.1 Tehnologija proizvodnje sira iz mišine u pokusu

Za proizvodnju sira koristilo se svježe punomasno ovčje mlijeko pasmine Dalmatinska pramenka. Mlijeko se sakupljalo od jutarnje i večernje mužnje koja je provedena strojno te do procesa proizvodnje skladištilo u laktofrizu na 4 °C.

Nakon što se u mlijeko za sirenje dodala sol (1,1 kg soli/100 L mlijeka), mlijeko se u duplikatoru temperiralo na 32 °C te, prema uputama proizvođača, dodalo mikrobno sirilo u prahu (Maxiren). Nakon 45-60 minuta, koliko je trajalo sirenje, gruš se sirarskim harfama rezao do veličine graška ili oraha te dogrijavalo do 38-39 °C tako da se svake dvije minute temperatura povećavala za 1 °C (sušenje sirnog zrna trajalo je od 10 do 15 minuta).

Kada se sirno zrno dovoljno osušilo, sadržaj iz duplikatora prelio se na distribucijski stol na kojem se gruš odvojio od sirutke. Kada se sirutka ocijedila, gruš se još jedanput posolio i stavljao u plastične samoprešajuće kalupe u kojima je ostao narednih 2-4 sata uz okretanje 2-3 puta (slika 3.1.) nakon čega je preko noći ostavljen na drvenoj polici u zrioni.



Slika 3.1. Sir u kalupima (Izvor: fotografija, D. Petrović)

Sutradan se sir rezao na komade veličine 10x10x5 cm, solio krupnom morskom soli (slika 3.2.) te potom stavljao u mišinu na stranu od mesa (slika 3.3.) a janjeća je koža prije punjenja namakana u sirutci i/ili toploj vodi da omekša (slika 3.4.).



Slika 3.2. Soljenje sira krupnom morskom soli (Izvor: fotografija, D. Petrović)



Slika 3.3. Spremanje sira u mišinu (Izvor: fotografija, D. Petrović)



Slika 3.4. Izgled osušene mišine prije njezina potapanja u vodu/sirutku i punjenja sirom (Izvor: fotografija, D. Petrović)

Zrenje sira u mišini trajalo je 30 dana pri temperaturi od 16 °C do 18 °C i relativnoj vlažnosti zraka od 65 % do 80 % (slika 3.5. i slika 3.6.).



Slika 3.5. Zrenje sira iz mišine

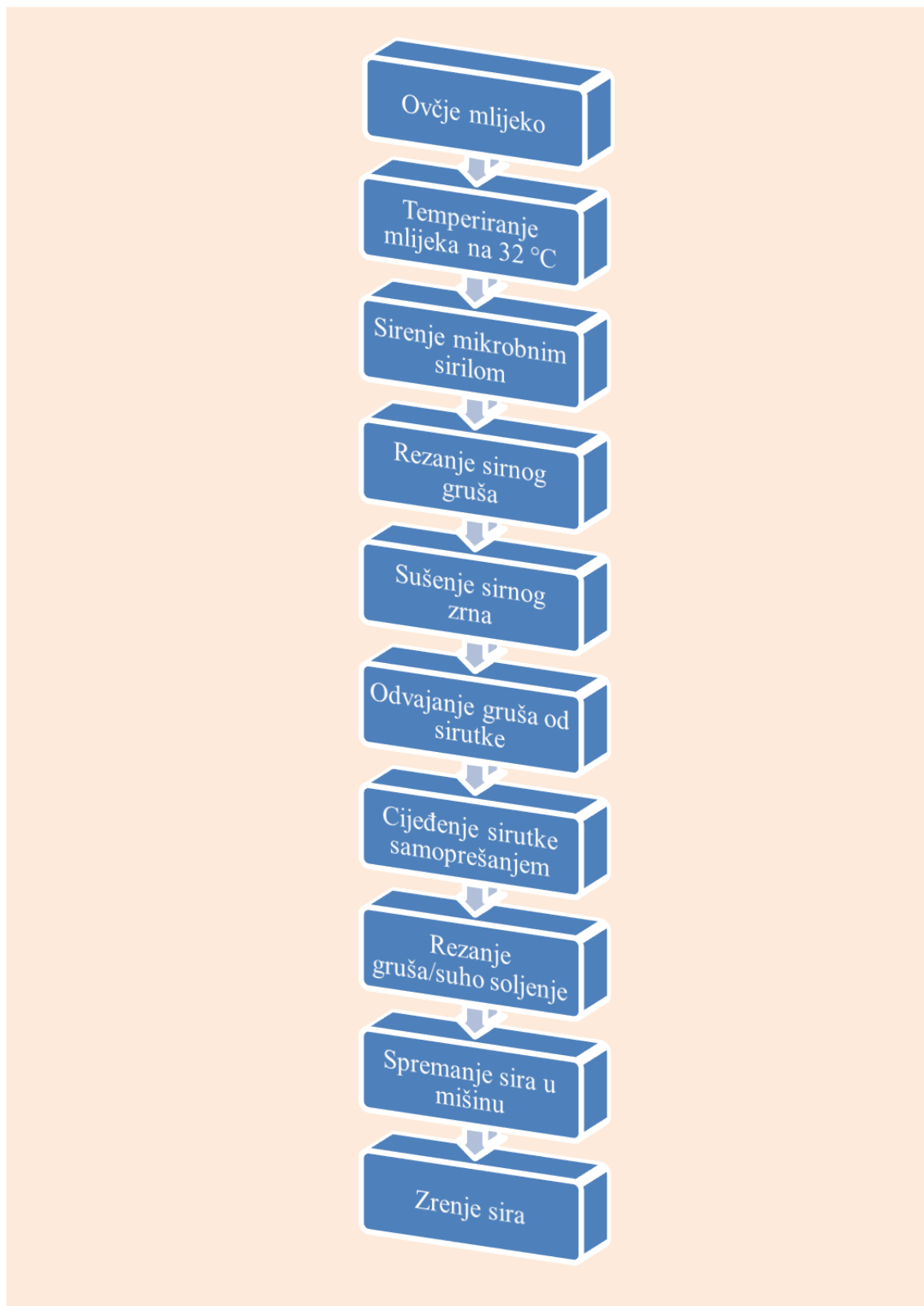
(Izvor: fotografija, D. Petrović)



Slika 3.6. Vlagomjer za mjerenje

relativne vlažnosti zraka (Izvor:

fotografija, D. Petrović)



Slika 3.7. Dijagram toka proizvodnje sira iz mišine

3.2 Uzorkovanje mlijeka i sira

Za istraživanje kemijskog sastava, fizikalnih svojstava i mikrobiološke kakvoće ovčjeg mlijeka za proizvodnju sira iz mišine uzimao se uzorak skupnog mlijeka jutarnje i večernje mužnje. Za istraživanje fizikalno-kemijskih, proteolitičkih i teksturnih promjena tijekom zrenja sira iz mišine, uzorkovanje se provodilo u vremenskim razmacima od 15 dana tijekom perioda zrenja od 30 dana (uzorci sireva uzimani su 0., 15. i 30. dana zrenja). Za provođenje spomenutih analiza, mišina se otvarala sterilnim nožem te se uzimalo oko 100 g uzorka sira, a prije samih analiza odstranjen je gornji sloj (otprilike 0,5 cm). Potom se mišina ponovno zatvorila i vratila u standardne uvjete zrenja.

3.3 Analize ovčjeg mlijeka

U cilju utvrđivanja kemijskog sastava, fizikalnih svojstava i higijenske kakvoće sirovog ovčjeg mlijeka provedene su sljedeće analize:

- kemijski sastav mlijeka (udio proteina, laktoze, mliječne masti, suhe tvari i suhe tvari bez mliječne masti) metodom infra-crvene spektrometrije (HRN ISO 9622:2001) na instrumentu MilkoScan FT 120,
- udio kazeina izravnom metodom (HRN ISO 17997-2:2010) na instrumentu Kjeltex 2300,
- pH-vrijednost potenciometrijskom metodom pomoću Mettler Toledo SG78-B SevenGo Duo Pro i elektrode InLab Solids Pro ISM,
- točka leđišta krioskopskom metodom (HRN EN ISO 5764:2010) na instrumentu Cryostar I,
- gustoća pomoću laktodenzitometra

3.4 Analize kemijskog sastava i fizikalnih svojstava sira iz mišine

U cilju utvrđivanja kemijskog sastava i fizikalnih svojstava sira iz mišine provedene su sljedeće analize:

- udio suhe tvari u siru određen je metodom sušenja na $102\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ do konstantne mase (HRN ISO 5534:2008),

- udio mliječne masti metodom po Van Guliku (HRN ISO 3433:2009),
- udio proteina Kjeldahlovom metodom (HRN EN ISO 8968-2:2003),
- udio vodotopljivog dušika (WSN) i dušika topljivog u 12 %-tnoj trikloroctenoj kiselini (TCA-SN) metodom blok digestije (HRN EN ISO 8968-2:2003).
- udio soli metodom po Volhardu (AOAC 935.43),
- pH-vrijednost pomoću pH-metra 340 (Mettler Toledo, Švicarska)

3.5 Analize primarnih i sekundarnih proteolitičkih promjena u siru iz mišine tijekom zrenja

Za procjenu intenziteta primarnih proteolitičkih promjena sira iz mišine tijekom zrenja korištena je metoda gel-elektroforeze na poliakrilamidnom gelu (urea-PAGE). 0,4 g prethodno naribanog sira iz mišine odvagalo se u epruvetu i otpipetiralo 5 ml urea-pufera. Sadržaj epruvete zatim se termostatirao u vodenoj kupelji 30 minuta pri temperaturi od 40 °C dok se sir potpuno nije otopio. Potom se sadržaj 10 minuta centrifugirao na 3600 okretaju u minuti pri temperaturi od 4 °C. Vakuum sisaljkom uklonio se izdvojeni sloj masti, a 100 µL nadtaloga pomiješao se s 300 µL pufera za uzorke. 6 µL tako pripremljenog uzorka nanesen je na jažicu gela. Gelovi su skenirani pomoću uređaja Gel Doc 2000 (BIO RAD) na kojem su također određene denzitometrijske vrijednosti bendova na gelu pomoću programa Quantity One, Quantitation Software (BIO RAD). Denzitometrijske vrijednosti izražene su u postotku pojedine frakcije kazeina u odnosu na ukupnu količinu u urea puferu topljivih kazeinskih frakcija elektroforetograma svakog uzorka.

Denzitometrijskim mjerenjem određeni su sljedeći indeksi zrelosti:

- $\Sigma\gamma\text{-CN}/\beta\text{-CN}$ (ukupni relativni udio svih $\gamma\text{-CN}$ u odnosu na $\beta\text{-CN}$); $I_{\gamma/\beta}$
- $\alpha_{s1}\text{-I-CN}/(\alpha_{s1}\text{-I-CN} + \alpha_{s1}\text{-I-CN})$ (relativni udio razgradnog fragmenta $\alpha_{s1}\text{-I-CN}$ u odnosu na sumu $\alpha_{s1}\text{-CN}$ i $\alpha_{s1}\text{-I-CN}$); I_{α} .

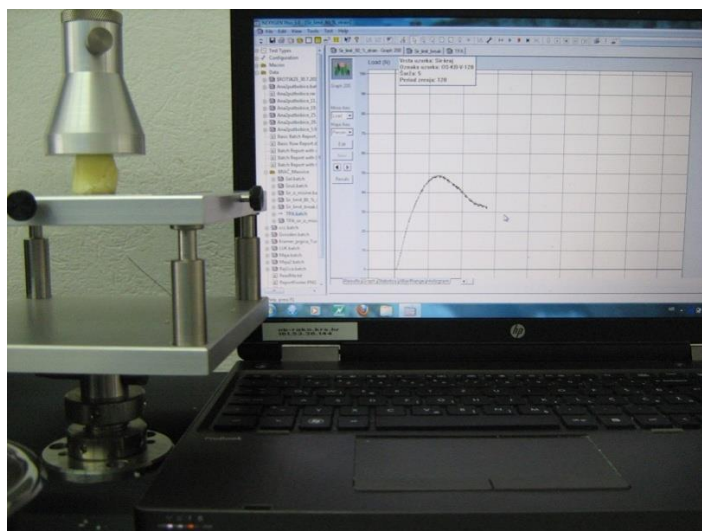
Procjena sekundarnih proteolitičkih promjena mjerila se kao:

- udio dušičnih tvari topljivih u vodi (WSN) u odnosu na ukupni dušik (TN): pokazuju količinu polipeptida male i srednje dužine, slobodnih aminokiselina te njihovih soli, a koje nastaju kao posljedica kimozijske aktivnosti i u manjoj mjeri plazmitske aktivnosti.
- udio dušičnih tvari topljivih u trikloroctenoj kiselini (TCA-SN) u odnosu na ukupni dušik (TN): pokazuju količinu neproteinskog dušika i slobodnih aminokiselina, a koje nastaju kao posljedica proteolitičke aktivnosti mikrobnih kultura i nestarterske mikrobne populacije te u manjoj mjeri kimozijske aktivnosti.

Procjena sekundarnih proteolitičkih promjena sastojala u odvazi 20 g naribanog sira iz mišine u kojeg se dodalo 180 g redestilirane vode te se tako pripremljena smjesa 60 minuta miješala na temperaturi od 50 °C. Smjesa se zatim centrifugirala 30 minuta na 5 °C pri 3600 okretaja u minuti i filtrirala kroz Schleidher i Schuell 595 1/2 Folded filter. Dobiveni je filtrat još jednom filtriran kroz Miliporni filtrat (GS, 0,22 µm), a udio dušičnih tvari topljivih u vodi određen je Kjeldahlovom metodom.

3.6 Mjerenje čvrstoće sira

Tekstura sira mjerila se testom kompresije pomoću teksturnog analizatora opremljenog mjernom stanicom od 500 N, a kao alat se koristila okrugla ploča promjera 50 mm. Uzorak sira cilindričnog oblika postavljen je na radnu površinu, a gornja pomična ploča je spuštена do površine samog uzorka. Radi sprječavanja trenja i pojave nehomogene deformacije uzorka, obje površine su prethodno premazane uljem niskog viskoziteta. Nakon pokretanja teksturnog analizatora i postizanja vrijednosti predtestne sile okidača, započelo je mjerenje, a uzorak je bio podvrgnut kompresiji prema sljedećim softverskim postavkama: vrijednost predtestne sile okidača – 0,05 N, kompresija uzorka – 70 % od njegove početne visine, promjer i visina uzorka – 17/25 mm, brzina kretanja ploče tijekom kompresije te brzina povratka ploče u početno stanje nakon obavljene kompresije – 50 mm/min. Navedeni postupak vidljiv je u obliku krivulje na grafikonu a pomoću softvera Nexygen izračunata je čvrstoća kao najveća vrijednost sile tijekom kompresije i izražena je u njutnima (N).



Slika 3.8. Mjerenje čvrstoće sira testom kompresije (Izvor: fotografija, D. Petrović)

3.7 Statistička obrada

Statistička obrada podataka izvršila se korištenjem statističkog programa SPSS.

4. Rezultati i rasprava

4.1 Fizikalno-kemijska svojstva ovčjeg mlijeka

Tablica 4.1. Fizikalno-kemijska svojstva ovčjeg mlijeka

Pokazatelj	X	Min.	Max.	SG	SD
Mliječna mast (%)	6,25	7,15	9,61	0,24	0,77
Proteini (%)	6,18	5,39	6,69	0,12	0,37
Laktoza (%)	4,04	3,83	4,24	0,04	0,13
Suha tvar (%)	19,53	17,75	21,06	0,30	0,96
Suha tvar bez mliječne masti (%)	11,32	10,63	11,57	0,09	0,27
Kazein (%)	4,76	4,12	5,11	0,10	0,32
Kazeiniski broj	76,96	74,10	79,01	0,51	1,62
Točka leđišta (°C)	-0,5668	-0,5950	-0,5429	0,0043	0,0135
Gustoća (g/cm ³)	1,0334	1,0300	1,0300	0,0003	0,0009
pH-vrijednost	6,68	6,56	6,77	0,02	0,06

x – srednja vrijednost; SG – standardna greška; SD – standardna devijacija

Dalmatinska pramenka najbrojnija je izvorna populacija ovaca u Republici Hrvatskoj koje se stoljećima uzgajaju na širem području Dalmacije i Dalmatinske zagore te na nekim našim otocima (Brač, Vis). Kombiniranih je proizvodnih odlika i uglavnom se koristi za proizvodnju mesa, a samo se u pojedinim gospodarstvima ovce muzu i mlijeko najčešće na vlastitom gospodarstvu prerađuje u sir ili se prodaje mljekarama (Mioč i sur., 2007; Širić i sur., 2009). Ovčje mlijeko, za razliku od kravljeg i kozjeg ima veći udio suhe tvari (14-18 %), time i veći udio proteina i mliječne masti, stoga je vrlo pogodno za proizvodnju sireva (veći randman) (Samaržija, 2015, Tratnik i Božanić, 2012).

Pod pojmom kakvoća mlijeka podrazumijeva se njegova sposobnost prijelaza sastojaka mlijeka u sir te učinkovitost postizanja poželjnog okusa, mirisa i teksture nakon završenog perioda zrenja (Bencini i Pulina, 1997). Prema Havranek i sur. (2014), kakvoću mlijeka određuju fizikalna, kemijska i organoleptička svojstva te higijenska kvaliteta. Najvažniji su kemijski parametri mlijeka za sirenje udio proteina (kazeina), udio mliječne masti i suhe tvari. Fizikalna svojstva koja izravno utječu na kvalitetu sira su kiselost i točka leđišta mlijeka dok se higijenska kvaliteta mlijeka temelji na procjeni ukupnog broja bakterija i broja somatskih stanica.

Uvjeti kojima ovčje mlijeko mora udovoljavati propisani su Pravilnikom o kakvoći svježeg sirovog mlijeka (NN 102/00). Prema Pravilniku, ovčje mlijeko mora sadržavati minimalno 4 % mliječne masti, minimalno 3,8 % proteina, minimalno 9,5 % bezmasne suhe tvari, gustoća mora biti od 1,034 g/cm³ do 1,042 g/cm³, pH-vrijednost od 6,5 do 6,8 (od 8,0 °SH do 12 °SH) dok točka leđišta ne smije biti viša od -0,56 °C. Iz tablice 4.1. je vidljivo da kakvoća ovčjeg mlijeka udovoljava odredbama Pravilnika o kakvoći svježeg sirovog mlijeka. Istraživanjem je utvrđeno da mlijeko Dalmatinske pramenke prosječno sadrži 19,35 % suhe tvari, 11,32 % suhe tvari bez mliječne masti, 6,25 % mliječne masti i 6,18 % proteina. Točka leđišta mlijeka prosječno je iznosila -0,5668 °C, a pH-vrijednost je bila 6,68. Manja vrijednost gustoće (1,0334 g/cm³) može se pripisati početnom stadiju laktacije ovaca. Naime, prosječna vrijednost gustoće ovčjeg mlijeka na početku laktacije iznosi 1,033 g/cm³, a na kraju 1,042 g/cm³, objašnjavaju Havranek i sur. (2014).

4.2 Fizikalno-kemijski sastav sira iz mišine

Tablica 4.2. Fizikalno-kemijski sastav sira iz mišine 30. dana zrenja

Sastojak sira	x	Min.	Max.	SG	SD
Suha tvar (%)	58,34	52,37	62,24	0,93	2,93
Voda u bezmasnoj tvari (%)	60,98	57,00	65,70	0,86	2,73
Mliječna mast (%)	31,40	27,50	34,50	0,67	2,11
Mliječna mast u suhoj tvari (%)	53,80	50,73	56,47	0,56	1,76
Proteini (%)	22,19	20,83	23,90	0,34	1,06
Proteini u suhoj tvari (%)	38,08	35,49	41,10	0,51	1,63
Sol (%)	1,93	1,45	2,71	0,13	0,41
pH-vrijednost	5,21	5,01	5,43	0,05	0,16
WSN (%TN)	28,79	17,98	43,63	2,92	9,24
TCA-SN (%TN)	18,60	12,65	26,34	1,56	4,94

x – srednja vrijednost; SD – standardna greška; SD – standardna devijacija

WSN (%TN) – frakcija dušika topljivog u vodi u ukupnom dušiku

TCA-SN (%TN) – frakcija dušika topljivog u 12 %-tnoj trikloroctenoj kiselini u ukupnom dušiku

Budući da udio vode u bezmasnoj tvari nakon 30 dana zrenja iznosi 60,98 %, sir iz mišine pripada skupini polutvrđih sireva (tablica 4.2.). Do sličnih je rezultata došla i Vrdoljak (2016) koja je utvrdila da sir iz mišine nakon 45 dana zrenja sadrži od 58,11 % do 59,63 % vode u bezmasnoj tvari, a uzrok manjeg udjela vode u bezmasnoj tvari može se naći u dužem periodu zrenja sira iz mišine. U istraživanju kojeg su proveli Yilmaz i sur. (2005), tulum sir je nakon 90 dana zrenja pri temperaturi od 6-10 °C sadržavao 65,27 % vode u bezmasnoj tvari te je također kategoriziran kao polutvrđi sir. Spomenuti udio vode u bezmasnoj tvari može se pripisati nižoj temperaturi zrenja tulum sira u odnosu na temperaturu zrenja sira iz mišine. Pri nižim temperaturama zrenja i sam je proces evaporacije znatno sporiji te sukladno tome, sir zadržava više vode. Međutim, u nekim je istraživanjima sir iz mišine ipak kategoriziran u skupinu tvrdih sireva. U istraživanju koje su na siru iz mišine nakon 60 dana zrenja proveli Tudor Kalit i sur. (2014), udio vode u bezmasnoj tvari iznosio je 53,30 % što se opet može pripisati dvostruko dužem periodu zrenja i sukladno tome, većom evaporacijom. Isti su autori utvrdili udio vode u bezmasnoj tvari od 56 % nakon 30 dana zrenja sira iz mišine. Do istog je zaključka došao i Grbavac (2002) za hercegovački sir iz mijeha u kojem je udio vode u bezmasnoj tvari iznosio 41,04 %. U kontekstu dužine perioda zrenja sira iz mišine, značajno je napomenuti da se napredovanjem zrenja formira bogatija aroma, ali sir više kalira što je s ekonomskog stajališta svakako nepovoljno. Također, zbog veće koncentracije slobodnih aminokiselina i slobodnih masnih kiselina, tvrdi i polutvrđi sirevi koji dugo zriju imaju i veću nutritivnu vrijednost. Ceylan i sur. (2007) objašnjavaju kako je smanjenje udjela vode u siru tijekom zrenja posljedica mikrobiološkog rasta pri čemu dolazi do produkcije mliječne kiseline i evaporacije vode iz sira.

Prema prikazanim rezultatima analiza u poglavlju 4 i u skladu s Pravilnikom o sirevima i proizvodima od sireva (NN 20/09), odnosno prema udjelu mliječne masti u suhoj tvari (53,80 %), sir iz mišine nakon 30 dana zrenja pripada skupini punomasnih sireva. Do vrlo sličnog rezultata došao je i Grbavac (2002) koji je utvrdio da je udio mliječne masti u suhoj tvari mješnog sira 53,36 %, a slične su rezultate utvrdili i Milin (52,50 %), Tudor Kalit i sur. (2014) (53,66 %) te Vrdoljak (2016) (od 51,71 % do 56,72 %). Udio mliječne masti u siru iz mišine na kraju perioda zrenja (31,40 %) najbliža je rezultatima istraživanja koje su proveli Ceylan i sur. (2007) (32,00 %), Grbavac (2002) za sir iz mijeha (31,19 %), Yilmaz i sur. (2005) za tulum sir (29,50 %) te Millin (1969) (32,92 %). Međutim, udio mliječne masti manji je u odnosu na rezultate istraživanja kojeg su proveli Serhan i sur. (2010) za Darfiyeh sir (od 42,24 % do 43,47 %), ali veća u odnosu na Divle Tulum sir i Cimi Tulum sir (od 21,3 % do 22,27 %) (Hayaloglu i Karagul-Yuceer, 2011). Mliječna mast u siru sudjeluje u kreiranju okusa i mirisa te utječe na njegovu prehrambenu vrijednost.

Proporcionalno trajanju zrenja, udio proteina se povećava i najveći je na kraju perioda zrenja kada iznosi 22,19 %, a gotovo iste rezultate je dobio i Grbavac (2010) za Planinski sir iz mješine (22,16 %). Slične su rezultate dobili Hayaloglu i Karagul-Yuceer (2011) za tulum sir (22,8 %), Grbavac (2002) za sir iz mišine (21,65 %) te Tudor Kalit i sur. (2014) (22,74 %).

Udio proteina u pokusnom siru bio je znatno niži u odnosu na rezultate koje je dobio Milin (1969) (od 24,08 % do 24,92 %) te Serhan i sur. (2010) za darfiyeh sir (od 31,21 % do 41,91 %).

Tijekom zrenja, udio vlage u siru iz mišine je varirao, a nakon 30 dana zrenja iznosio je 42,66 %, odnosno 58,34 % suhe tvari. Dobiveni rezultat najbliži je rezultatima istraživanja koje je na siru iz mijeha proveo Grbavac (2002) (58,96 %) te rezultatima koje je provela Vrdoljak (2016) (od 58,4 % do 61 %), ali manji u odnosu na rezultate koje su dobili Ceylan i sur. (2007) za tulum sir (65,06 %) te Tudor Kalit i sur. (2014) (64,97 %), a što se može pripisati dužem periodu zrenja i većem gubitku vlage. Znatno manji udio suhe tvari utvrdili su Serhan i sur. (2010) za darfiyeh sir (45,85 % - 50,29 %) te Yilmaz i sur. (2005) za tulum sir (53,04 %) a što se može pripisati nižoj temperaturi u zrionici.

Uspoređujući pH vrijednost sira iz mišine nakon 30 dana zrenja (5,21) s rezultatima većine drugih autora vidi se da je ona viša. Prema Yilmaz i sur. (2005) prosječna pH vrijednost tulum sira iznosi 5,03, a prema Serhan i sur. (2010) raspon pH vrijednosti darfiyeh sira iznosi od 4,99 do 5,06, dok su Tudor i sur. (2009) utvrdili pH-vrijednost sira iz mišine 5,35.

Prema Hrvatskoj inicijativi za smanjenje unosa kuhinjske soli, preporučeni dnevni unos soli za odraslu osobu je 5 g. Udio soli u siru iz mišine nakon 30 dana zrenja iznosi 1,93 % što znači da se konzumacijom 100 g sira iz mišine unese 38,6 % preporučenog dnevnog unosa soli za odraslu osobu, a što je manje u odnosu na udio soli u tulum siru (4,97 %) (Yilmaz i sur., 2005), darfiyeh siru (od 3,01 % do 9,56 %) (Serhan i sur., 2010), siru iz mijeha (3,59 %) (Grbavac, 2002) zbog dužeg perioda zrenja.

4.3 Fizikalno-kemijske promjene sira iz mišine tijekom zrenja

Tablica 4.3. Fizikalno-kemijske promjene sira iz mišine tijekom zrenja

Parametar	Trajanje zrenja (dani)			
	0	15	30	Razina značajnosti
Suha tvar (%)	55,20 ^a ± 0,67	56,75 ^{ab} ± 0,70	58,34 ^b ± 0,93	*
Mliječna mast (%)	28,98 ^a ± 0,59	30,98 ^{ab} ± 0,53	31,40 ^b ± 0,67	*
Udio mliječne masti u suhoj tvari (%)	52,49 ± 0,69	53,50 ± 0,50	53,80 ± 0,56	NZ
Proteini	20,94 ^a ± 0,30	21,56 ^{ab} ± 0,32	22,19 ^b ± 0,34	*
Udio proteina u suhoj tvari (%)	37,95 ± 0,46	38,01 ± 0,57	38,08 ± 0,51	NZ
Udio vode u bezmasnoj tvari (%)	63,07 ± 0,76	62,09 ± 0,63	60,98 ± 0,86	NZ
Sol (%)	1,15 ^a ± 0,05	1,68 ^b ± 0,10	1,93 ^b ± 0,13	**
pH-vrijednost	5,21 ^a ± 0,04	5,05 ^b ± 0,03	5,21 ^a ± 0,05	*

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna greška razlike; ^{a,b} vrijednosti u istom redu označene različitim slovima značajno se razlikuju ** (P < 0,01), * (P < 0,05), NZ = nema značajne razlike

Fizikalno-kemijske promjene sira iz mišine prikazane su u tablici 4.3. Zrenje sira iz mišine imalo je značajan utjecaj ($p < 0,05$) na fizikalno-kemijske promjene u siru. Udio suhe tvari, mliječne masti, mliječne masti u suhoj tvari, proteina, proteina u suhoj tvari, vode u bezmasnoj tvari, soli i udio dušičnih frakcija povećavao se tijekom zrenja što je u skladu s rezultatima istraživanja provedenih na drugim sirevima koji zriju u životinjskoj koži (Yilmaz i sur., 2005; Ceylan i sur., 2007; Hayaloglu i sur., 2007; Serhan i sur., 2010).

Uzimajući u obzir propusnost janjeće kože, tijekom zrenja sira iz mišine udio suhe tvari značajno ($p < 0,05$) se povećavao od početnih 55,20 % (0. dan) do krajnjih 58,34 % (30. dan). Prema rezultatima istraživanja, sir iz mišine u 30 dana zrenja izgubio je oko 7,01 % vode i to više u zadnja dva tjedna zrenja što je suprotno rezultatima koje su proveli Tudor Kalit i sur. (2014) i Serhan i sur. (2010). Uspoređujući sir koji zrije u životinjskoj koži i sir koji zrije u kori, Tudor Kalit (2012) je utvrdila da sir koji zrije u kori tijekom zrenja više kalira nego sir koji zrije u životinjskoj koži. Ponekad se u Turskoj zrenje sira u životinjskoj koži zamjenjuje zrenjem u drvenim ili plastičnim kacama, ali je gubitak vode puno brži kod sira koji zrije u koži u odnosu na sir koji zrije u plastičnoj ili drvenoj kaci (Hayaloglu i sur., 2007). Udio proteina tijekom zrenja sira iz mišine također se značajno povećavao ($p < 0,05$) s početnih 20,94 % do krajnjih 22,19 % kao i udio mliječne masti s početnih 28,98 % do krajnjih 31,40 %. Udio proteina tijekom zrenja povećao se za 5,64 %, dok se udio mliječne masti povećao za 7,71 %. Značajan porast udjela soli u siru iz mišine bio je u prvih 15 dana zrenja ($p < 0,05$) dok u zadnjih dva tjedna porast udjela soli nije bio statistički značajan. Porast udjela proteina, mliječne masti i soli tijekom zrenja u izravnoj je korelaciji sa gubitkom vode i povećanjem suhe tvari tijekom zrenja sira iz mišine.

4.4 Proteolitičke i teksturne promjene sira iz mišine tijekom zrenja

Tablica 4.4. Proteolitičke i teksturne promjene sira iz mišine tijekom zrenja

Parametar	Trajanje zrenja (dani)			
	0	15	30	Razina značajnosti
α_{s1} -kazein (%)	25,77 ^a ± 3,18	17,78 ^b ± 2,07	15,04 ^b ± 2,02	*
α_{s1} -I-kazein (%)	10,38 ^a ± 1,01	13,37 ^b ± 0,90	14,81 ^b ± 1,00	**
β -kazein (%)	53,31 ± 1,86	50,90 ± 2,26	48,20 ± 2,11	NZ
γ -kazein (%)	8,29 ^a ± 0,81	13,98 ^b ± 1,79	18,76 ^c ± 1,18	**
$I_{\gamma/\beta}$	0,15 ^a ± 0,02	0,28 ^b ± 0,04	0,40 ^c ± 0,04	**
I_{α}	0,31 ^a ± 0,04	0,42 ^b ± 0,03	0,53 ^c ± 0,04	**
WSN (% TN)	15,98 ^a ± 2,97	23,13 ^{ab} ± 2,68	28,79 ^b ± 2,92	**
TCA-SN (% TN)	9,00 ^a ± 1,14	14,66 ^b ± 1,34	18,60 ^c ± 1,56	**
Čvrstoća (N)	14,18 ^a ± 0,65	17,64 ^b ± 1,06	19,80 ^b ± 1,04	**

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna greška razlike; ^{a, b, c} vrijednosti u istom redu označene različitim slovima značajno se razlikuju ** (P < 0,01), * (P < 0,05), NZ = nema značajne razlike; N = newton; $I_{\gamma/\beta}$ = indeks beta, I_{α} = indeks alfa, WSN (%TN) – postotak u vodi topljivih frakcija dušika u ukupnom dušiku, TCA-SN (%TN) – postotak utrikloroctenoj kiselini topljivih frakcija dušika u ukupnom dušiku

Udio dušičnih tvari topljivih u vodi u odnosu na ukupni dušik (engl. water soluble nitrogen (% total nitrogen) – WSN (%TN)) koristi se kao indeks zrenja te kao pokazatelj stupnja proteolize, a prikazuje udio polipeptida male i srednje dužine, slobodnih aminokiselina te njihovih soli (Lavasani i sur., 2012). Navedeni produkti nastaju kao rezultat hidrolize α_{s1} -kazeina i β -kazeina djelovanjem kimoza i plazmina (primarna proteoliza). Iz tablice 4.4. je vidljivo da je udio dušičnih tvari topljivih u vodi tijekom 30 dana zrenja sira iz mišine u stalnom porastu. Prosječni udio WSN nakon 30 dana zrenja sira iz mišine iznosio je 28,79 %. Uspoređujući udio WSN u pokusnom siru iz mišine i siru darfiyeh (od 17,79 % do 20,14 %) (Serhan i sur., 2010) te siru iz mišine (23,69 %) (Tudor Kalit, 2012), vidljivo je da je proteoliza u pokusnom siru bila nešto intenzivnija. Suprotno, u istraživanju kojeg su proveli Ceylan i sur. (2007) na tulum siru (32,15 %), primarne proteolitičke promjene odvijale su se znatno intenzivnije u odnosu na pokusni sir. Predmetnim istraživanjem je utvrđen utjecaj zrenja na pokazatelje primarnih proteolitičkih promjena odnosno udjele α_{s1} i β -kazeina te udjele njihovih razgradnih produkata i pripadajućih indeksa zrelosti (Tablica 4.4.). Sukladno navedenom, udio α_{s1} -kazeina tijekom zrenja sira iz mišine značajno se smanjio ($P < 0,05$) s početnih 25,77 % do 15,04 % na kraju zrenja. Udio α_{s1} -kazeina značajno se smanjio u prvim dva tjedna zrenja zbog toga što u tom razdoblju kimozi brzo hidrolizira α_{s1} -kazein (niska pH-vrijednost i velika kimozinaska aktivnost). Uzročno posljedično, udio α_{s1} -I-kazeina značajno se povećao ($p < 0,01$) s početnih 10,38 % do krajnjih 14,81 %, najvećim intenzitetom u prva dva tjedna zrenja. Tijekom zrenja sira iz mišine, udio β -kazeina smanjio ($p > 0,05$) se s početnih 53,31 % do krajnjih 48,20 %, većim intenzitetom u drugoj polovici zrenja zbog veće plazmitske aktivnosti. Slijedom navedenog, udio γ -kazeina značajno se povećao ($p < 0,01$) s početnih 8,29 % do 18,76 %. Slične promjene spomenutih kazeinskih frakcija utvrđene su i tijekom zrenja Roncal (Irigoyen i sur., 2001), Ragusano (Fallico i sur., 2004) i Manchego (Gaya i sur., 1990) sireva. Vrijednosti indeksa alfa (I_{α}) koji predstavljaju relativni udio fragmenata α_{s1} -I-kazeina tijekom zrenja sira iz mišine značajno su se povećale ($p < 0,01$) isto kao i vrijednosti indeksa beta ($I_{\gamma/\beta}$) koji predstavljaju relativni udio svih γ -kazeina u odnosu na β -kazein ($p < 0,01$).

Kasnije tijekom zrenja sira, dušična frakcija topljiva u vodi hidrolizira se djelovanjem endogenih i egzogenih enzima starterske i nestarterske mikrobiote pri čemu nastaju kratki peptidi i aminokiseline topljivi u 12 % trikloroctenoj kiselini (engl. trichlor- acetic soluble nitrogen (% total nitrogen) – TCA-SN (%TN)) (McSweeney i Sousa, 2000). Iz tablice 4.4. je vidljivo da je udio dušičnih tvari topljivih u 12 % trikloroctenoj kiselini tijekom 30 dana zrenja sira iz mišine u stalnom porastu ($p < 0,01$). Prosječni udio TCA-SN nakon 30 dana zrenja sira iz mišine iznosio je 18,60 % (tablica 4.4). Uspoređujući udio TCA-SN u pokusnom siru iz mišine i siru darfiyeh (od 14,03 % do 18,24 %) (Serhan i sur., 2010) te siru iz mišine (9,44 %) (Tudor Kalit, 2014), može se zaključiti da je intenzivnija hidroliza dušične frakcije topljive u trikloroctenoj kiselini u pokusnom siru iz mišine.

Bez obzira da li se govori o polutvrdom, tvrdom, mekom siru ili siru za mazanje, uz okus i miris, tekstura predstavlja najvažniji parametar kakvoće sira (Marshall, 1990; Petrović,

2015). Predmetnim istraživanjem utvrđen je značajan utjecaj ($p < 0,01$) zrenja na vrijednost čvrstoće sira iz mišine (Tablica 4.4). Vrijednost čvrstoće povećala se s prosječnih 14,18 N u početku zrenja na 19,80 N na kraju zrenja sira iz mišine. Uzrok povećanja čvrstoće tijekom zrenja sira iz mišine može se pronaći u povećanju udjela proteina tijekom zrenja, intenzivnoj proteolitičkoj aktivnosti, povećanju udjela soli te smanjenju udjela vode u bezmasnoj tvari sira (tablica 4.3 i tablica 4.4).

4.5 Povezanost fizikalno-kemijskih, proteolitičkih i teksturnih promjena sira iz mišine tijekom zrenja

Tablica 4.5. Povezanost fizikalno-kemijskih, proteolitičkih i teksturnih promjena sira iz mišine tijekom zrenja

Parametar	Čvrstoća (N)
Mliječna mast (%)	0,205
Proteini (%)	0,446 *
Suha tvar (%)	0,242
pH-vrijednost	-0,188
Sol (%)	0,290
WSN (% TN)	0,134
TCA-SN	0,417 *
γ -kazein (%)	0,492 **
β -kazein (%)	-0,565 **
α_{s1} -kazein (%)	-0,612 **
α_{s1} -I-kazein (%)	0,15
$I_{\gamma/\beta}$	0,636 **
I_{α}	0,447 *

*P < 0,05; **P < 0,01

Iz tablice 4.5. je vidljivo da postoji snažni korelacijski odnos između fizikalno-kemijskih, proteolitičkih i teksturnih promjena sira iz mišine tijekom zrenja. Kao što je već spomenuto, proteolitičke promjene odgovorne su za karakterističnu teksturu i aromu sira. Iz tablice 4.5. vidljiva je značajna pozitivna korelacija između udjela proteina, udjela dušičnih frakcija topljivih u trikloroctenoj kiselini, indeksa alfa (I_α) ($p < 0,05$), gama kazeina, i indeksa beta ($p < 0,01$) i čvrstoće (teksturni profil) sira iz mišine. Naime, hidrolizom trodimenzionalne proteinske mreže izravno dolazi do smanjenja aktiviteta vode i neizravno do povećanja pH-vrijednosti što je uzrok povećanja čvrstoće sira iz mišine tijekom zrenja (tablica 4.4). U prva dva tjedna zrenja, zbog niže pH-vrijednosti sira veća je kimozijska aktivnost pa dolazi do povećanja udjela α_{s1} -I-kazeina (tablica 4.4.). Proteinski fragmenti nastali hidrolizom α_{s1} -kazeina su ili gorki ili bez okusa a njihovo je nastajanje značajno za omekšavanje gumene i elastične mase sira u prvih 15 dana zrenja. U drugom je vremenskom razdoblju aktivnost kimozijska puno manja, ali je veća aktivnost plazmina te enzima starterske i nestarterske mikrobne populacije, uslijed čega dolazi do povećanja pH-vrijednosti i suhe tvari sira, a time i čvrstoće. Prema tome, veći udio proteina u siru uvjetuje manji udio vode, a time i veću čvrstoću sira iz mišine (Prentice (1994) i Walstra i sur. (2006)). Drugim riječima, napredovanjem primarne proteolize kazeina povećava se indeks alfa pri čemu nastaju proteinski fragmenti koji predstavljaju supstrate za sekundarnu proteolizu zbog čega se poveća udio dušičnih frakcija topljivih u trikloroctenoj kiselini. Iako prema literaturnim podacima primarnu proteolizu vezujemo uz teksturu, a sekundarnu proteolizu uz kreiranje arome, navedena dva procesa ne možemo grubo odvojiti. Kao zaključak se može navesti da na teksturni profil sira iz mišine utječu i primarne i sekundarne proteolitičke promjene, budući da se i tijekom sekundarne proteolize povećava udio suhe tvari, a time se povećava i čvrstoća. Značajno je napomeniti da na teksturni profil, utječu α_{s1} -I-kazein i β -kazein za koje je uočena značajna ($p < 0,01$) negativna korelacija sa čvrstoćom sira iz mišine (tablica 4.5). Djelovanjem kimozijska na α_{s1} -kazein nastaje α_{s1} -I-kazein koji zajedno sa indeksom beta ($I_{\gamma/\beta}$) doprinosi teksturnom profilu sira iz mišine isto kao i β -kazein i γ -kazein kao produkt njegove hidrolize djelovanjem plazmina (primarna proteoliza).

5. Zaključci

Na temelju rezultata ovog istraživanja mogu se donijeti sljedeći zaključci:

1. S obzirom na udio vode u bezmasnoj tvari (60,98 %) sir iz mišine nakon 30 dana zrenja pripada skupini polutvrdih sireva, a s obzirom na udio mliječne masti u suhoj tvari (53,80 %) pripada skupini punomasnih sireva.
2. Tijekom zrenja sira iz mišine, udio suhe tvari, mliječne masti, mliječne masti u suhoj tvari, proteina, proteina u suhoj tvari te soli se povećava, dok se udio vode u bezmasnoj tvari sira smanjuje što je ekvivalentno rezultatima istraživanja drugih sireva koji zriju u životinjskoj koži.
3. Veći udio dušičnih frakcija topljivih u vodi (28,79 %) i trikloroctenoj kiselini (18,60 %) u siru iz mišine ukazuje na intenzivnije primarne i sekundarne proteolitičke reakcije u usporedbi s rezultatima istraživanja većine drugih sireva koji zriju u životinjskoj koži.
4. Dokazan je snažni korelacijski odnos između fizikalno-kemijskih, proteolitičkih i teksturnih promjena sira iz mišine tijekom zrenja. Vidljiva je značajna pozitivna korelacija između udjela proteina, udjela dušičnih frakcija topljivih u trikloroctenoj kiselini, indeksa alfa (I_α) ($p < 0,05$), gama kazeina, i indeksa beta ($p < 0,01$) i čvrstoće (teksturni profil) sira iz mišine.

6. Popis literature

Addeo, F., Chianese, L., Salzano, A., Sacchi, R., Cappuccio, U., Ferranti, P., & Malorni, A. (1992). Characterization of the 12% trichloroacetic acid-insoluble oligopeptides of Parmigiano-Reggiano cheese. *Journal of Dairy Research*, 59, 401–411.

AOAC (2000). Acidity of Cheese, Titrimetric Method, AOAC Official Method 920.124. Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists.

AOAC (2000). Chloride (Total) in Cheese, Volhard Method AOAC Official Method 935.43. Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists.

Antunac, N., Lukač Havranek, J. (1999). Proizvodnja, sastav i osobine ovčjeg mlijeka. *Mljekarstvo*, 49: 241-254.

Antunac, N., Havranek, J. (2013). Mlijeko-kemija, fizika i mikrobiologija. Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet, Zagreb

Bachmann, H. P., McNulty, D. A., McSweeney, P. L. H., Rübegg, M. (1996). Experimental designs for studying the influence of the raw milk on cheese characteristics: a review. *The Journal of the Society of Dairy Technology* 49, 53 – 56.

Bansal, N., Fox, P.F., McSweeney, P.L.H. (2007). Factors Affecting the Retention of Rennet in Cheese Curd. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55: 9219–9225.

Bencini, R., Pulina, G. (1997). The quality of sheep milk: A review. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 37: 485–504.

Bendelja, D., Antunac, N., Mikulec, N., Vnučec, I., Mašek, T., Mikulec, Ž., Havranek, J. (2009). Koncentracija ureje u ovčjem mlijeku. *Mljekarstvo* 59 (1), 3-10

Benfeldt, C., Sorensen, J., Ellegard, K. H., & Petersen, T. E. (1997). Heat treatment of cheese milk: effect on plasmin activity and proteolysis during cheese ripening. *International Dairy Journal*, 7, 723–731.

Bijeljac, S., Sarić, Z. (2005). Autohtoni mliječni proizvodi sa osnovama sirarstva. Poljoprivredni Fakultet Univerziteta u Sarajevu, Sarajevo, Bosna i Hercegovina.

Blažanović, M. (2015.). Čimbenici koji utječu na koncentraciju ureje u mlijeku. Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet. Završni rad

Cakmakci, S., Gurses, M., Gundogdu, E. (2011). The effect of different packaging materials on proteolysis, sensory scores and gross composition of tulum cheese.

African Journal of Biotechnology 10, 4444-4449.

CASEY, M. G., HANI, J. P., GRUSKOVNJAK, J., SCHAEREN, W., WECHSLER, D. (2006). Characterisation of non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) of Groyere PDO cheese. *Lait*, 86 (6), 407-414.

Ceylan, Z.G., Caglar, A., Cakmakci, S. (2007). Some physicochemical, microbiological and sensory properties of tulum cheese produced from ewe's milk via modified method. *Int. J. Dairy Technol.* 60, 191-196.

Collins, Y.F., McSweeney, P.L.H., Wilkinson, M.G. (2003). Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: a review of current knowledge. *Int. Dairy J.* 13, 841-866.

Creamer, L.K., Olson, N.F. (1982). Rheological evaluation of maturing Cheddar cheese. *Journal of Food Science*, 47: 631-636.

Dalgleish, D.G. (1994). The enzymatic coagulation of milk. U: *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Vol. 1. An Aspen Publication: 63-93.

Delgado, F.J., Crespa, J.G., Cava, R., Ramirez, R. (2011). Formation of the aroma of a raw goat milk cheese during maturation analysed by SPME–GC–MS. *Food Chemistry* 129, 1156-1163.

Fallico, V., McSweeney, P.L.H., Siebert, K.J., Horne, J., Carpino, S., Licitra, G. (2004). Chemometric Analysis of Proteolysis During Ripening of Ragusano Cheese. *Journal of Dairy Science*, 87: 3138–3152.

Fenelon, M.A., Guinee, T.P. (1999). The Effect of Milk Fat on Cheddar Cheese Yield and Its Prediction, Using Modifications of the Van Slyke Cheese Yield Formula. *Journal of Dairy Science*, 82: 2287–2299.

Fox, P.F. (1989). Proteolysis during cheese manufacture and ripening. *Journal Dairy Science* 72, 1379-1400.

Fox, P.F, McSweeney, P.L.H. (1998). *Dairy chemistry and biochemistry*, Thomson Science, London, Velika Britanija.

Fox, P.F., Guinee, T.P., Cogan, T.M., McSweeney, P.L.H. (2000a). *Biochemistry of cheese ripening*. U: *Fundamentals of cheese science* (Colilla, J., ured.), Aspen Publishers, Gaithersburg, Maryland, SAD, str. 236-278.

Fox, P.F., Guinee, T.P., Cogan, M.T., McSweeney, P.L H. (2000b). *Fundamentals of Cheese Science*. An Aspen Publication.

Fröhlich-Wyder, M.T., Bachmann, H.P. (2004). *Cheeses with propionic acid fermentation*. U: *Cheese-Chemistry, Physics & Microbiology Vol.2*. Elsevier Academic Press: 141-156.

Fuquay J.W. i sur. (2011). *Encyclopedia of dairy sciences* second edition, Elsevier.

Gagnaire, V., Thierry, A., & Leonil, J. (2001). Propionibacteria and facultatively heterofermentative lactobacilli weakly contribute to secondary proteolysis of Emmental cheese. *Lait*, 81, 339–353.

Gaya, P., Medina, M., Rodriguez-Marin, M.A., Nuñez, M. (1990). Accelerated ripening of ewes' milk Manchego cheese the effect of elevated ripening temperatures. *Journal of Dairy Science*, 73: 26-32.

Grbavac, J. (2002). Istraživanje proizvodnje i kakvoće sira iz mješine pod nazivom Ovčji planinski sir iz Zapadne Hercegovine. Magistarski rad, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

Grbavac, J. (2010). Proizvodnja i kakvoća ovčjeg planinskog sira iz mješine u zapadnoj Hercegovini. Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet. Doktorska disertacija.

Gubić, J (2016). Profil proteina i sastav masnih kiselina mleka magarice balkanske rase tokom perioda laktacije. Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet. Doktorska disertacija.

Guinee, P.T. (2004). Salting and role of salt in cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 57: 99-109.

Guinee, P.T., Fox, F.P. (2004). Salt in cheese: physical, chemical and biological aspects. U: *Cheese-Chemistry, Physics & Microbiology Vol.1*. Elsevier Academic Press: 207-259.

Guinee, T.P., Auty, M.A.E., Fenelon, M.A., (2000). The effect of fat content on the rheology, microstructure and heat-induced functional characteristics of Cheddar cheese. *International Dairy Journal*, 10: 277-288.

Gunasekaran, S., Ak, M.M. (2003). *Cheese Rheology and Texture*. CRC Press.

Havranek, J., Kalit, S., Antunac, N., Samaržija, D. (2014). *Sirarstvo*, Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb

Hayaloglu, A.A., Fox, P.F., Guven, M., Cakmakci, S. (2007a). Cheeses of Turkey: 1. Varieties ripened in goat-skin bags. *Lait* 87, 79-95.

Hayaloglu, A.A., Cakmakci, S., Brechany, E.Y., Deegan, K.C., McSweeney, P.L.H. (2007b). Microbiology, biochemistry, and volatile composition of Tulum cheese ripened in goat's skin or plastic bags. *Journal of Dairy Science* 90, 11202-1121.

Hayaloglu, A.A., Karagul-Yuceer, Y. (2011). Utilization and characterization of small ruminants' milk and milk products in Turkey: Current status and new perspectives. *Small Ruminant Research* 101, 73-83.

Hayaloglu, A.A., Yasar, K., Tolu, C., Sahingil, D. (2013a). Characterizing volatile compounds and proteolysis in Gokceada artisanal goat cheese. *Small Ruminant Research* 113, 187-194.

Hayaloglu, A.A., Tolu, C., Yasar, K., Sahingil, D. (2013b). Volatiles and sensory evaluation of goat milk cheese Gokceada as affected by goat breeds (Gokceada and Turkish Saanen) and starter culture systems during ripening. *Journal of Dairy Science* 96, 2765–2780.

Hickey, D.K., Kilcawley, K.N., Beresford, T.P., Sheehan, E.M. (2007). Starter strain related effects on the biochemical and sensory properties of Cheddar cheese. *Journal of Dairy Research*, 74, 9-17.

Hort, J., Grys, G.L. (2001). Developments in the textural and rheological properties of UK Cheddar cheese during ripening. *International Dairy Journal*. 11: 475-481.

HRN ISO 9622 (2001). Punomasno mlijeko-Određivanje udjela mliječne masti, bjelančevina i laktoze-Upute za rad MID-infrared instrumentima. Hrvatski zavod za norme, Zagreb.

HRN EN ISO 8968-2 (2003). Mlijeko-Određivanje sadržaja dušika. 2-dio: metoda blok-digestije.

HRN EN ISO 13366-2 (2007). Mlijeko-Brojanje somatskih stanica-2. dio: Upute zarad Fluor-opto-elektronskim brojačem. Hrvatski zavod za norme, Zagreb.

HRN EN ISO 5534 (2008). Sir i topljeni sir-Određivanje sadržaja suhe tvari (Referentna metoda).

HRN ISO 3433 (2009). Sir-Određivanje udjela masti-Van Gulikova metoda.

HRN EN ISO 5764 (2010). Mlijeko-određivanje točke leđišta-termistorsko krioskopska metoda. Hrvatski zavod za norme, Zagreb.

HRN ISO 17997 - 2 (2010). Mlijeko-određivanje udjela kazeinskog dušika 2. dio: direktna metoda. Hrvatski zavod za norme, Zagreb.

Irigoyen, A., Izco, J.M., Ibáñez, F.C., Torre, P. (2001). Influence of rennet milk-clotting activity on the proteolytic and sensory characteristics of an ovine cheese. Food Chemistry, 72: 137-144.

Irigoyen, A., Castiella, M., Ordóñez, A.I., Torre, P., Ibáñez, F.C. (2002). Sensory and instrumental evaluations of texture in cheese made from ovine milks with differing fat contents. Journal of Sensory studies, 17: 145-161.

Johnston, K.A., Dunlop, F.P., Coker, C.J., Wards, S.M. (1994). Comparisons between the electrophoretic pattern and textural assessment of aged Cheddar cheese made using various levels of calf rennet or microbial coagulant (Rennilase 46L). International Dairy Journal, 4: 303-327.

Kaic D, Kalit S, Tudor M and Vrdoljak M (2008). Hygienic quality of sheep milk for manufacture of autochthonous cheese ripened in lamb sack (misina) in the hinterland of

Sibenik. Book of Abstracts, The 38th Croatian Dairy Experts Symposium with international participation, November 23rd–26th 2008, Lovran, Croatia.

Kaić, D., Skelin, A., Mrkonjić Fuka, M., Kalit, S., Kalit Tudor, M., Redžepović, S. (2011). Prirodna mikrobna populacija u Siru iz mišine. Proceedings of the 47.th Croatian and 7.th International Symposium on Agriculture, Opatija, str. 697-700.

Kalit, S. (2002.). Zrenje sireva, Četvrto savjetovanje uzgajivača ovaca i koza u Republici Hrvatskoj, Varaždinske toplice, 47 – 56.

Kalit, S., Havranek-Lukač, J., Čubrić Čurik, V. (2002). Plazmin: indogena proteinaza mlijeka. Mljekarstvo, 52: 191-206.

Kalit, S., Lukač Havranek, J., Kapš, M., Perko, B., Čubrić Čurik, V. (2005). Proteolysis and the optimal ripening time of Tounj cheese. Int Dairy J 15, 619-624.

Kalit S. (2008). Mlijeko kao čimbenik u proizvodnji sira, Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet, Zavod za mljekarstvo (interna skripta)

Kalit, S. (2013.). Kazein i njegova uloga u nastajanju gruša i izdvajanju sirutke, Petnaesto savjetovanje uzgajivača ovaca i koza u Republici Hrvatskoj, Šibenik, 99 – 105.

Kalit, S. (2015). Opće sirarstvo U: Sirarstvo u teoriji i praksi, Veleučilište u Karlovcu, Karlovac, Hrvatska

Kalit, S. (2015). Utjecaj kvalitete mlijeka i tehnoloških postupaka proizvodnje na randman sira, Sedamnaesto savjetovanje uzgajivača ovaca i koza u Republici Hrvatskoj, Varaždin, 21 – 31.

Kalit, S. (2015). Tradicionalni sirevi Hrvatske i Slovenije U: Sirarstvo u teoriji i praksi, Veleučilište u Karlovcu, Karlovac, Hrvatska

Kalit, S. (2016). Proizvodnja ovčjih i kozjih sireva od sirovog mlijeka. Projekat "Tehnička pomoć u koordinaciji Programa kontrole i iskorjenjivanja bolesti životinja u Bosni i Hercegovini - Faza III", Bosna i Hercegovina.

Karlson P. (1993). Biokemija, Školska knjiga, Zagreb

Kenny, O., FitzGerald, R.J., O' Cuinn, G., Beresford, T., Jordan, K. (2006). Autolysis of selected *Lactobacillus helveticus* adjunct strains during Cheddar cheese ripening. *International Dairy Journal*, 16, 794-804.

Kulić, Lj., Hardi, J., Carić, M. (1991). Sastav arome topljenih sireva proizvedenih uz primenu prirodnih aroma Cheddar sira i Parmezana. *Mljekarstvo* 41 (2) 41—50

Larreyoz, P., Mendia, C., Torre, P., Barcina, Y., Ordonez, I. (2002). Sensory profile of flavor and odor characteristics in Roncal cheese made from raw ewes milk. *J. Sensory Stud.* 17, 415-427.

Lavasani, A.R.Z., Ehsani, M.R., Mirdamadi, S., Mousavi, M.A.E.Z. (2012). Changes in physicochemical and organoleptic properties of traditional Iranian cheese Lighvan during ripening. *Int. J. Dairy Technol.* 65, 64-70.

Le Quéré, J.L., Cayot, N. (2013). Instrumental assessment of the sensory quality of dairy products. U: *Instrumental assessment of Food Sensory Quality*, Woodhead Publishing Limited: 420-445.

Lovrić (2003). *Procesi u prehrambenoj industriji s osnovama prehrambenog inženjerstva*, HINUS, Zagreb.

Lteif, L., Olabi, A., Kebbe Baghdadi, O., Toufeili, I. (2009). The characterization of the physicochemical and sensory properties of full-fat, reduced-fat, and low-fat ovine and bovine Halloumi. *Journal of Dairy Science*, 92: 4135–4145.

Lucey, A.J., Johnson, E.M., Horne, S.D. (2003). Invited review: Perspectives on the basis of the rheology and texture properties of cheese. *Journal of Dairy Science*, 86: 2725-2743.

Lucey, J.A. (2009). Milk protein gels. U: *Milk Proteins: from Expression to Food*. Elsevier: 450-458.

Lukač Havranek, J. (1995). Autohtoni sirevi Hrvatske. *Mljekarstvo* 45 (1) 19-37

Lukač Havranek, J., Hadžiosmanović, M., Samaržija, D., Antunac, N. (2000). Prehrambena svojstva mediteranskih sireva. *Mljekarstvo* 50 (2) 141-150

Mačej, O., Jovanović, S., Barać, M. (2007). Faktori koji utiču na koagulaciju mleka sirilom. U: *Proteini mleka*. Poljoprivredni fakultet, Beograd-Zemun: 227-243.

Marenjak, T., Poljičak-Milas, N., Stojević, Z. (2004). Svrha određivanja koncentracije ureje u kravljem mlijeku. *Praxis veterinaria* 52 (3), 233-241.

Marilley, L., Casey, M.G. (2004). Flavours of cheese products: metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains. *International Journal of Food Microbiology* 90, 139-159.

Marshall, R. J. (1990). Composition, structure, rheological properties and sensory texture of processed cheese analogues. *J. Sci. Food Agric.*, 50, 237-252.

Martin, B., Coulon, J.B., Chamba, J.F., Bugaud, C. (1997). Effect of milk urea content on characteristics of matured Reblochon cheeses. *Lait*, 77: 505-514.

Matutinović i sur. (2007). Značaj tradicijskih sireva s posebnim osvrtom na Lećevečki sir. *Mljekarstvo* 57 (1) 49-65.

McSweeney, P.L.H., Fox, P.F. (1999). Methods of Chemical Analysis. In: Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. P.F. Fox (Ed.), Vol. 1: General Aspects, An Aspen Publ., Gaithersburg, MD, USA, 341-388.

McSweeney, P.H.L., Sousa, M.J. (2000). Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: A review. *Lait*. 80: 293-324.

McSweeney, P.L. (2004). Biochemistry of cheese ripening. *Int. J. Dairy Technol.* 57, 127-144.

Mikulec, N., Habuš, I., Antunac, N., Vitale, Lj., Havranek, J. (2010). Utjecaj peptida i aminokiselina na formiranje arome sira. *Mljekarstvo* 60, 219-227.

Mikulec, N. (2010). Promjene sadržaja topljivih peptida i aminokiselina tijekom zrenja Krčkog sira. Disertacija. Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet, Zagreb.

Milin, M. (1969). Prilog poznavanju proizvodnje i kvalitete mješnog sira u okolici Knina. Magistarski rad, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

Mioč, B., Pavić, V., Sušić, V. (2007.). Ovčarstvo. Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb.

Molkentin, J. (2000). Occurrence and biochemical characteristics of natural bioactive substances in bovine milk lipids. *Brit. J. Nutr.* 84, S47-S53.

Mrkonjić Fuka, M., Mutak, V., Kaić, D., Skelin, A., Kalit, S., Tudor Kalit, M., Režepović, S. (2013). Procjena antibiotske rezistencije kod bakterija rodova *Lactococcus* i *Enterococcus* izoliranih iz Sira iz mišine

Ong, L., Dagastine, R.R., Kentish, S.E., Gras, S.L. (2012). The effect of pH at renneting on the microstructure, composition and texture of Cheddar cheese. *Food Research International*. 48: 119-130.

Petrović, D. (2015). Fizikalno-kemijske, mikrobiološke i promjene strukture tijekom zrenja kravljeg, ovčjeg i miješanog sira. Veleučilište u Karlovcu. Završni rad.

Pinho, O., Ferreira, I.M.P.L.V.O., Ferreira, M.A. (2003). Quantification of short-chain free fatty acids in terrincho ewe cheese: Intravarietal comparison. J. Dairy Sci. 86, 3102-3109.

Pravilnik o sirevima i proizvodima od sireva (2009). Narodne novine, broj 20.

Prentice, J.H. (1994). Cheese rheology. U: Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, Vol. 1. An Aspen Publication: 299-343.

Prieto, B., Franco, I., González Prieto, J., Bernardow, A., Carballo, J. (2002). Compositional and physico-chemical modifications during the manufacture and ripening of León raw cow's milk cheese. J. Food Compos. Anal. 15, 725–735.

Puđa, P. (2009). Tehnologija mleka 1, Sirarstvo - opšti deo. Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, Beograd.

Rako A. (2015). Tradicijski sirevi od mlijeka dalmatinske pramenke. Zbornik radova sa stručno znanstvenog skupa: Gospodarske mogućnosti Zagore i oblici njihova optimalnog iskorištavanja: 41-47

Rako, A. (2016.). Utjecaj sastava ovčjeg mlijeka na proteolitičke i teksturne promjene bračkog sira tijekom zrenja. Doktorska disertacija. Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet.

Ramkumar, C. (1997). The effect of pH shift on early cheese maturation. Doctoral Dissertation, Food technology, Massey University.

Ritzoulis, C. (2013). Rheology. U: Introduction to the Physical Chemistry of Foods. CRC Press: 157-171.

Rohm, H., Jaros, D. (2002). Rheology of milk and dairy products-Instrumentation.U: Encyclopedia of Dairy Sciences. Elsevier: 2438-2445.

Samaržija, D., Antunac, N. (2002). Oznake kvalitete: izvornost (PDO), zemljopisno podrijetlo (PGI) i garantirano tradicijski specijalitet (TSG) u socijalnoj i gospodarstvenoj zaštiti tradicionalne proizvodnje sira. *Mljekarstvo* 52, 279-290.

Samaržija, D. (2003). Kvaliteta ovčjeg mlijeka i specifičnost ovčjih autohtonih sireva. Peto savjetovanje uzgajivača ovaca i koza u Republici Hrvatskoj. *Zbornik predavanja*: 74-82.

Samaržija D. (2015). Fermentirana mlijeka: Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb

Sánchez-Macías, D., Fresno, M., Moreno-Indias, I., Castro, N., Morales-dela Nuez, A., Álvarez, S. (2010). Physicochemical analysis of full-fat, reduced-fat, and low-fat artisan-style goat cheese. *Journal of Dairy Science*, 93: 3950-3956.

Sarić, Z., Puhan, Z., Dizdarević, T. (2007). Sirarska proizvodnja na raskršću tradicije i industrije. „SAVREMENA POLJOPRIVREDA” VOL. 56, 5 (2007) STR. 103–113, NOVI SAD

Serhan, M., Linder, M., Hosri, C., Fanni, J. (2007). Evolution of lipolysis during ripening of traditional Lebanese Darfiyeh cheese. 5th Euro Fed Lipid Congress and 24th Nordic Lipid Symposium Oils, Fats and Lipids: From Science to Applications –Innovations for a better world, 16-19 rujan 2007, Gothenberg, Švedska.

Serhan, M., Linder, M., Hosri, C., Fanni, J. (2010). Changes in proteolysis and volatile fraction during ripening of Darfiyeh, a Lebanese artisanal raw goat's milk cheese. *Small Ruminant Res.* 90, 75-82.

Sousa, M.J., Malcata, F.X. (1997). Comparison of plant and animal rennets in terms of microbiological, chemical, and proteolysis characteristics of ovine cheese. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 45: 74-81.

Širić, I., Mioč, B., Pavić, V., Antunović, Z., Vnućec, I., Barać, Z., Prpić, Z. (2009). Vanjština dalmatinske prameke. *STOČARSTVO* 63:2009 (4) 263-273

Tejkal, LJ. (1913). *Sirarstvo u Dalmaciji*. Nagragijena tiskara E. Vitaliani, Zadar.

Tratnik, Lj. (1998). Zrenje sireva. U: *Mlijeko – tehnologija, biokemija i mikrobiologija* (Volarić, V., ured.) Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb, Hrvatska, str. 280-296.

Tratnik, Lj., Božanić, R. (2012). *Mlijeko i mliječni proizvodi*, Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb.

Tudor, M., Kalit, S., Havranek, J., Kaić, D., Vrdoljak, M., Horvat, I. (2008). Fizikalno-kemijska karakterizacija autohtonog ovčjeg sira iz mišine. 38. hrvatski simpozij mljekarskih stručnjaka s međunarodnim sudjelovanjem, Lovran, str. 56-57.

Tudor, M., Kalit, S., Havranek, J., Kaić, D., Vrdoljak, M. (2009). Tehnologija proizvodnje i kvaliteta sira iz mišine. 44. hrvatski & 4. međunarodni simpozij agronoma, 16- 20. veljače 2009., Opatija, Hrvatska, Zbornik sažetaka, 238.

Tudor Kalit, M., Kalit, S., Havranek, J. (2010). An overview of researches on cheeses ripening in animal skin. *Mljekarstvo* 60 (3), 149-155

Tudor Kalit, M. (2012). *Određivanje sastava i udjela slobodnih masnih kiselina sira iz mišine te njegova fizikalno-kemijska i senzorska svojstva*. Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet. Doktorska disertacija.

Tudor Kalit, Milna; Kalit, Samir; Delaš, Ivančica; Kelava, Nikolina; Karolyi, Danijel; Kaić, Dubravka; Vrdoljak, Marija; Havranek, Jasmina (2014). Changes in the composition and sensory properties of Croatian cheese in a lamb skin Usor iz mišine) during ripening. *International journal of dairy technology*. **67**, 2; 255-264

Upadhyay, V.K., McSweeney, P.L.H., Magboul, A.A.A., Fox, P.F. (2004). Proteolysis in Cheese during ripening. U: Cheese-Chemistry, Physics & Microbiology Vol.1. Elsevier Academic Press: 391-433.

Van den Berg, G., Exterkate, F.A. (1993). Technological parameters involved in cheese ripening. International Dairy Journal, 3: 485-507.

Zebec, V. (2016). Mikrobiološka kvaliteta mlijeka u proizvodnji sira od sirovog mlijeka. Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet. Završni rad

Vintila, C., Marcu, A. (2011). Milk urea disappears during milk processing into cheese. Animal Science and Biotechnologies, 44: 455-457.

Vrdoljak, M. (2016). Probiotičke kulture *Lactobacillus plantarum* B i *Lactobacillus lactis* subsp. *lactis* S1 u poboljšanju funkcionalnih svojstava sira iz mišine. Doktorska disertacija. Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet.

Walstra, P., Wouters, J.T.M., Geurts, T.J. (2006). Dairy science and technology. Taylor & Francis.

Williams, A.G., Noble, J., Tammam, J., Lloyd, D., Banks, J.M. (2002). Factors affecting the activity of enzymes involved in peptide and amino acid catabolism in non-starter lactic acid bacteria isolated from Cheddar cheese. International Dairy Journal, 12, 841-852.

Yilmaz, G., Ahmet, A., Akin, N. (2005). The effect of microbial lipase on the lipolysis during the ripening of Tulum cheese. J. Food Eng. 69, 269-274.

7. Popis slika i tablica

POPIS SLIKA:

Slika 2.1. Katabolizam slobodnih masnih kiselina

Slika 2.2. Opći putovi katabolizma slobodnih aminokiselina

Slika 2.3. Biokemijski procesi nastajanja spojeva okusa i arome sira

Slika 2.4. Sir iz mišine, sir iz mijeha, Tulum sir, Darfiyeh sir

Slika 3.1. Sir u kalupima

Slika 3.2. Soljenje sira krupnom morskom soli

Slika 3.3. Spremanje sira u mišinu

Slika 3.4. Izgled osušene mišine prije njezina punjenja sirom

Slika 3.5. Zrenje sira iz mišine

Slika 3.6. Vlagomjer za mjerenje relativne vlažnosti zraka

Slika 3.7. Dijagram toka proizvodnje sira iz mišine

Slika 3.8. Mjerenje čvrstoće sira testom kompresije

POPIS TABLICA:

Tablica 4.1. Fizikalno-kemijska svojstva ovčjeg mlijeka

Tablica 4.2. Fizikalno-kemijski sastav sira iz mišine 30. dana zrenja

Tablica 4.3. Fizikalno-kemijske promjene sira iz mišine tijekom zrenja

Tablica 4.4. Proteolitičke i teksturne promjene sira iz mišine tijekom zrenja

Tablica 4.5. Povezanost fizikalno-kemijskih, proteolitičkih i teksturnih promjena
sira iz mišine tijekom zrenja

8. Životopis autora

Denis Petrović rođen je 25. kolovoza 1992. godine u Puli. Završio je osnovnu školu u Juršićima i srednju Strukovnu školu u Puli, smjer prehrambeni tehničar. Godine 2012. upisao je preddiplomski stručni studij prehrambene tehnologije na Veleučilištu u Karlovcu, a završio ga je 2015. godine obranom završnog rada pod nazivom “Fizikalno-kemijske, mikrobiološke i promjene strukture tijekom zrenja kravljeg, ovčjeg i miješanog sira” pod vodstvom doc. dr. sc. Marijane Blažić. Dobitnik je Dekanove nagrade za postignuti uspjeh u akademskoj godini 2013./2014. Koautor je stručno-znanstvenog rada “Utjecaj pesticida na ljudsko zdravlje”. Godine 2015. upisao je diplomski studij “Proizvodnja i prerada mlijeka” na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Godine 2016. u sklopu projekta LifeADA pohađao je ljetnu školu u Mostaru pod nazivom “Autochthonous Dairy Products”.